

Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Krankenhaushygiene
Biomedizinisches Forschungszentrum (BMFZ)
Direktor: Prof. Dr. Michael Lohoff



**Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren IRF4 und
IRF9 auf die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort
während der Infektion mit intrazellulären Erregern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Josephine Ritter

aus Berlin

Marburg, Februar 2016

Vorgelegt dem Fachbereich Medizin am: 05.02.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Magdalena Huber

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Burchert

Zusammenfassung

Interferon Regulierende Faktoren (IRF) sind Transkriptionsfaktoren (TF), die vielfältige Funktionen in der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort besitzen. Im Zusammenspiel miteinander oder mit weiteren TF regulieren sie die Genexpression. Die essentielle Rolle von IRF4 für die Differenzierung in Subtypen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist bereits beschrieben worden. Für IRF9 ist bekannt, dass es ubiquitär in Zellen exprimiert wird. Im Interferon stimulierenden Genfaktor 3 (ISGF3)-Komplex wird IRF9 als DNA-bindende Domäne in Assoziation mit den Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT) 1 und 2 in Antwort auf Stimulation mit Typ I IFN aktiviert. CD8⁺ T-Zellen werden durch Infektionen mit intrazellulären Pathogenen aktiviert. Klassischerweise proliferieren sie daraufhin sehr stark und differenzieren sich zu zytotoxischen Effektorzellen. Nach Beseitigung der Erreger überlebt nur eine geringe Anzahl von Effektorzellen, die sich zu langlebigen Gedächtniszellen entwickeln. Bei chronischen Infektionen können aktivierte CD8⁺ T-Zellen jedoch auch in einen Zustand der Erschöpfung übergehen. Dieser Zustand ist durch eine eingeschränkte Effektorfunktion gekennzeichnet und konventionelle CD8⁺ T-Gedächtniszellen werden nicht generiert. Bei Infektionen mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) kann man zwischen chronischen Infektionen, verursacht durch LCMV Klon 13- und akuten Infektionen, hervorgerufen durch LCMV Armstrong (Arm), unterscheiden. In Antwort auf virale Infektionen bindet der ISGF3-Komplex, der durch den kanonischen Typ I IFN-Signaltransduktionsweg induziert wird, an IFN-stimulierende responsive Elemente (ISRE). Dadurch wird die Expression von antiviralen Genen (ISGs) induziert. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl *Stat1*^{-/-} als auch *Stat2*^{-/-} Mäuse sehr anfällig gegenüber viralen Infektionen sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Bedeutung von IRF4 für die Funktion von CD8⁺ T-Zellen während einer Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* (*Lm*) untersucht. *Irf4*^{-/-} Mäuse konnten Listerieninfektionen nur teilweise beseitigen, was u.a. auf eine defekte CD8⁺ Effektor T-Zellantwort zurückzuführen ist. Antigenspezifische *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen proliferierten während der Infektion nur sehr schwach und waren durch

einen fehlenden Effektorphänotyp und die eingeschränkte Produktion von Effektormolekülen gekennzeichnet. Mit Hilfe von adoptiven Zelltransfers wurde die zellintrinsische Bedeutung von IRF4 für CD8⁺ T-Zellen demonstriert. In Übereinstimmung mit Defekten in der Effektorzelldifferenzierung war die mRNA-Expression der TF *Prdm1*, *Tbx21* und *Id2* in *Irf4*^{-/-} Mäusen stark erniedrigt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass IRF4 an ein IL-21 responsives Element bindet, das sich außerhalb des codierenden Bereichs von *Prdm1* (codiert BLIMP1) befindet und für die optimale *Prdm1*-Expression benötigt wird. Somit trägt die Regulation der BLIMP1-Expression durch IRF4 wahrscheinlich zur Effektorzelldifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen bei. Neben der Effektorzelldifferenzierung wird auch die Generierung und Funktion von langlebigen Gedächtniszellen positiv durch IRF4 beeinflusst.

Im zweiten Teil wurde die Rolle von IRF9 bei der antiviralen CD8⁺ T-Zellantwort untersucht. Nach einer Infektion mit LCMV Arm entwickelten *Irf9*^{-/-} Mäuse, im Gegensatz zu Wildtyp (WT) Mäusen, eine chronische Erkrankung, bei der die antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen sowohl den Phänotyp als auch die Funktion von erschöpften Zellen aufwiesen. *Irf9*^{-/-} Mäuse entwickelten eine geringe Anzahl an LCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die den Aktivierungsmarker KLRG1 stark reduziert exprimierten und nur geringe Mengen der Effektorzytokine TNFα und IFNγ produzierten. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung exprimierten *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen verstärkt die inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und LAG-3. Des Weiteren ist IRF9 positiv in die Regulation der TBX21-Expression involviert. TBX21 fördert zum einen die terminale Differenzierung von CD8⁺ Effektor T-Zellen. Zum anderen verhindert TBX21 die Erschöpfung von CD8⁺ T-Zellen während chronischer Infektionen, indem es die PD-1-Expression direkt unterdrückt und auch die Expression von LAG-3 reguliert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit zum einen gezeigt werden, dass IRF4 bei einer Listerieninfektion als zentraler TF die Generierung von funktionellen CD8⁺ Effektor T-Zellen ermöglicht und zum anderen, dass IRF9 als wichtiger TF die Erschöpfung von CD8⁺ T-Zellen während einer akuten LCMV-Infektion verhindert.

Summary

The interferon regulatory factors (IRF) are transcription factors (TF) that possess a variety of functions in the regulation of innate and adaptive immunity, to regulate the gene expression in association with each other or with further TFs. IRF4 is crucial for the differentiation into distinct subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. IRF9 is ubiquitously expressed in cells. It functions as DNA binding domain in response to type I IFN in the transcriptional complex interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF3) in association with signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and 2. Following infection with intracellular pathogens, CD8⁺ T cells become activated, proliferate rapidly and differentiate into cytotoxic T lymphocytes (CTLs). After clearance of pathogens only a limited number of effector cells survive and develop into long-lived memory cells. During chronic infections activated CD8⁺ T cells may become exhausted, what is characterized by impaired functions and incapability to form conventional memory CD8⁺ T cells. Infections with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) can be distinguished into chronic infections, caused by LCMV clone 13 and acute LCMV Armstrong (Arm) infections. In response to viral infections the transcriptional complex ISGF3, induced by canonical type I IFN signaling, binds to IFN-stimulated response element (ISRE) sequences to activate classical antiviral genes (ISGs) and it is known, that both *Stat1*^{-/-} and *Stat2*^{-/-} mice are highly susceptible to viral infections.

The first part of this thesis investigated the influence of IRF4 for CD8⁺ T cells during an immune response against the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* (*Lm*). *Irf4*^{-/-} mice showed partially impaired clearance of *Listeria* infection, which was due to a reduced CD8⁺ T cell response. Antigen-specific *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T cells showed limited accumulation in different organs and these cells also displayed an altered effector phenotype as well as impaired effector function. Transfer experiments revealed that IRF4 functions in CD8⁺ T cells in a cell intrinsic manner. In line with these observed defects, *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T cells showed reduced levels of TF associated with effector cell differentiation, such as *Prdm1*, *Tbx21* and *Id2*. Furthermore it was shown that IRF4 bound to an IL-21 responsive element downstream of *Prdm1* (encoding BLIMP1) suggesting that regulation of BLIMP1 by IRF4 contributes to the generation of CD8⁺

effector cells. It is likely that IRF4 is also essential for memory cell generation, because *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T cells also showed impaired memory formation.

The second part focused on the IRF9-dependency of the antiviral CD8⁺ T cell response. Upon infection with LCMV Arm, *Irf9*^{-/-} mice developed chronic disease in contrast to WT mice. This was accompanied by an exhausted phenotype of pathogen-specific CD8⁺ T cells in *Irf9*^{-/-} mice. As a result *Irf9*^{-/-} mice developed reduced numbers of LCMV-specific CD8⁺ T cells with diminished expression of the activation marker KLRG1, and with impaired production of the effector cytokines TNF α and IFN γ . In accordance with these results *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T cells strongly upregulated the inhibitory receptors PD-1 and LAG-3. IRF9 is also involved in the positive regulation of the expression of the TF TBX21, which promotes terminal differentiation of CD8⁺ effector T cells and prevents exhaustion of CD8⁺ T cells during chronic infection by direct repression of PD-1 and regulation of LAG-3 expression.

In conclusion the results of this PhD thesis identified a key role for IRF4 in the generation of functional effector CD8⁺ T cells, while IRF9 protects CD8⁺ T cells from exhaustion during acute LCMV infection.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS IMMUNSYSTEM	1
1.2	T-ZELLEN.....	1
1.3	ZYTOTOXISCHE CD8 ⁺ T-ZELLEN (CTLs).....	2
1.4	DIFFERENZIERUNGSWEGE VON CD8 ⁺ T-ZELLEN.....	3
1.4.1	<i>Effektorzelldifferenzierung.....</i>	<i>3</i>
1.4.2	<i>Zustand der Erschöpfung.....</i>	<i>6</i>
1.5	DIE TRANSKRIPTIONSFAKTORFAMILIE DER INTERFERON REGULIERENDEN FAKTOREN (IRFs)8	
1.5.1	<i>Der Transkriptionsfaktor Interferon regulierender Faktor 4 (IRF4).....</i>	<i>9</i>
1.5.2	<i>Der Transkriptionsfaktor Interferon regulierender Faktor 9 (IRF9).....</i>	<i>11</i>
1.6	TIEREXPERIMENTELLE VERSUCHSMODELLE ZUM STUDIUM DER CD8 ⁺ T-ZELLANTWORT	13
1.6.1	<i>Listeria monocytogenes.....</i>	<i>13</i>
1.6.2	<i>Lymphozytäres Choriomeningitis Virus (LCMV).....</i>	<i>14</i>
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
2	MATERIAL.....	16
2.1	LABORGERÄTE UND LABORZUBEHÖR.....	16
2.2	REAKTIONSKITS	17
2.3	CHEMIKALIEN.....	18
2.4	MEDIEN UND PUFFER	20
2.5	ANTIKÖRPER UND ZYTOKINE.....	23
2.5.1	<i>Unkonjugierte Antikörper</i>	<i>23</i>
2.5.2	<i>Konjugierte Antikörper für FACS-Analysen.....</i>	<i>23</i>
2.5.3	<i>MHC-I Dextramere.....</i>	<i>25</i>
2.5.4	<i>Western Blot-Antikörper</i>	<i>25</i>
2.5.5	<i>ChIP-Antikörper.....</i>	<i>25</i>
2.5.6	<i>Zytokine.....</i>	<i>26</i>
2.6	GRÖßENSTANDARDS UND MARKER	26
2.7	PRIMER.....	26
2.8	ZELLINIEN.....	27
2.9	MIKROORGANISMEN	27
2.10	MAUSSTÄMME	28
3	METHODEN	29

3.1	ARBEITEN MIT LISTERIEN	29
3.1.1	Herstellen eines Listerienstocks.....	29
3.1.2	Infektion mit Listerien und LCMV.....	29
3.1.3	Bestimmung der Bakterienlast	30
3.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	30
3.2.1	Zellzahlbestimmung.....	30
3.2.2	Kultivierung von EL4-Zellen.....	31
3.2.3	Anreicherung von CD8 ⁺ T-Zellen aus sekundär lymphatischen Organen.....	31
3.2.4	Aktivierung und Differenzierung von CD8 ⁺ T-Zellen zu zytotoxischen Zellen.....	32
3.2.5	Adoptiver Zelltransfer	32
3.2.6	Aufreinigung von Zellen aus Milz, Leber und Knochenmark	33
3.2.7	Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung mit Hilfe von Antikörpern.....	33
3.2.8	Dextramerfärbung von antigenspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	34
3.2.9	Peptidspezifische Aktivierung der CD8 ⁺ T-Zellen.....	35
3.2.10	CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester)-Färbung	35
3.2.11	Zytotoxizitätstest ex vivo.....	36
3.2.12	Durchflusszytometrie und Zellsortierung	36
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	37
3.3.1	Proteinlysate	37
3.3.2	Proteinbestimmung nach Pierce	38
3.3.3	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
3.3.4	Western Blot.....	39
3.3.5	Proteindetektion durch Antikörper.....	40
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	41
3.4.1	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	41
3.4.2	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	42
3.5	STATISTIK	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	DER EINFLUSS VON IRF4 AUF DIE DIFFERENZIERUNG VON EFFEKTOR CD8 ⁺ T-ZELLEN	47
4.1.1	IRF4 ist essentiell für die Kontrolle einer Listerieninfektion.....	47
4.1.2	IRF4 wird für die Ausbildung eines Effektorphänotyps benötigt.....	49
4.1.3	Die mangelhafte Kontrolle der Listerieninfektion ist durch <i>Irf4</i> ^{-/-} CD8 ⁺ T-Zellen bedingt.	51
4.1.4	<i>Irf4</i> ^{-/-} Mäuse generieren eine defekte antigenspezifische CD8 ⁺ T-Zellantwort	53

4.1.5	<i>Die IRF4-Expression wird in CD8⁺ T-Zellen durch TZR-Aktivierung induziert und korreliert mit der Ausbildung des Effektorphänotyps.....</i>	57
4.1.6	<i>Irf4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen weisen während der Listerieninfektion Defekte in der Akkumulationsfähigkeit auf</i>	60
4.1.7	<i>Die Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen ist IRF4-abhängig.....</i>	61
4.1.8	<i>IRF4 beeinflusst die transkriptionelle Regulation der CD8⁺ T-Zellen.....</i>	65
4.1.9	<i>IRF4 kontrolliert die IL-21-abhängige Prdm1-Expression in CD8⁺ T-Zellen.....</i>	66
4.1.10	<i>IRF4 ist essentiell für die CD8⁺ Gedächtniszellentwicklung.....</i>	68
4.2	DER EINFLUSS VON IRF9 AUF CD8⁺ T-ZELLEN WÄHREND EINER AKUTEN LCMV-INFEKTION	73
4.2.1	<i>IRF9 beeinflusst die Akkumulation und den Phänotyp von LCVM-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.....</i>	73
4.2.2	<i>IRF9 verhindert die Erschöpfung von CD8⁺ T-Zellen</i>	75
4.2.3	<i>CD8⁺ T-Zellen aus Irf9^{-/-} Mäusen halten den Zustand der Erschöpfung 30 Tage nach der LCMV-Infektion aufrecht.....</i>	79
5	DISKUSSION	83
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	107
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	109
9	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....	111
10	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	112
11	DANKSAGUNG	113

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus effektiv vor Erkrankungen durch Pathogene wie z.B. Bakterien und Viren. Man unterscheidet dabei zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Das angeborene Immunsystem leitet eine sofort verfügbare primäre unspezifische Immunantwort ein, wobei die Zellen des angeborenen Immunsystems Chemokine und Zytokine sezernieren und so Zellen des adaptiven Immunsystems anlocken und aktivieren können. Zellen des adaptiven Immunsystems sind Lymphozyten wie B-, T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen, die Pathogene mit Hilfe ihrer hochspezifischen klonal verteilten Antigenrezeptoren erkennen. B-Zellen differenzieren nach der Antigenerkennung zu Plasmazellen und sezernieren Immunglobuline, Effektormoleküle der adaptiven Immunantwort. Immunglobuline erkennen spezifisch lösliche Antigene (Ag) und können diese durch Neutralisierung oder Opsonisierung unschädlich machen. T-Helferzellen (Th) sezernieren Zytokine um u.a. B- und $CD8^+$ T-Zellen zu aktivieren, wodurch dann Pathogene eliminiert werden können. Zytotoxische T-Zellen sezernieren Effektormoleküle wie z.B. Perforin und Granzyme um die Apoptose von pathogeninfizierten Zellen oder Tumorzellen zu induzieren.

1.2 T-Zellen

Hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wandern in den Thymus ein und reifen dort zu T-Zellen. Die Differenzierung erfolgt dabei über einen Selektionsprozess. Bei der positiven Selektion im Thymuskortex überleben Zellen die körpereigene *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Moleküle erkennen. Im weiteren Schritt der Reifung werden Zellen die körpereigene Peptide erkennen diesmal negativ selektiert. Dieser Selektionsmechanismus gewährleistet eine immunologische, sogenannte zentrale Toleranz. Nach abgeschlossener Reifung wandern nur ca. 5% der T-Zellen in periphere Lymphorgane, wo ihnen Fremdartige über MHC-Moleküle von Antigenpräsentierenden Zellen (APZs) präsentiert werden. Naive T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (TZR) über den

Peptid:MHC-Komplex. Th-Zellen erkennen ihr spezifisches Peptid über MHC-II Moleküle, während zytotoxische T-Zellen (CTLs) mit MHC-I Molekülen assoziiert sind. Die Aktivierung von naïven T-Zellen erfolgt über 3 Signale; Antigenerkennung über Bindung des TZR an den Peptid: MHC-Komplex (*priming*); über kostimulatorische Moleküle (CD28:CD80/CD86) und durch sezernierte Zytokine von APZs. In Abhängigkeit vom Zytokinmilieu differenzieren T-Zellen in verschiedene funktionelle Klassen von Effektor T-Zellen mit unterschiedlichen speziellen Funktionen (Janeway et al., 2008).

1.3 Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTLs)

Zytotoxische T-Zellen (CTLs) tragen das heterodimere Glykoprotein CD8 auf ihrer Oberfläche und werden daher CD8⁺ T-Zellen genannt. Im Gegensatz dazu exprimieren Th-Zellen das Molekül CD4 auf ihrer Oberfläche. Bei der Antigenerkennung bindet CD8 an die invarianten Abschnitte der $\alpha 3$ - und $\alpha 2$ -Domänen des MHC-I Moleküls und initiiert eine intrazelluläre Signalkaskade. Der TZR bildet mit dem CD3-Molekül (δ, γ und zwei ϵ Ketten) und 2 ζ Ketten den TZR-Komplex. Die Antigenerkennung über den TZR führt zur Phosphorylierung der ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) an den zytoplasmatischen Domänen der ζ - und der CD3 δ -, γ - und ϵ -Ketten. Daraufhin bindet ZAP-70 an die phosphorylierte ζ -Kette, wird aktiviert und leitet die Signalkaskade weiter ins Zellinnere, die dann in der Aktivierung der TF NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*), AP-1 (*Activator Protein-1*) und NF κ B (*Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) im Nukleus und somit in der Aktivierung der T-Zelle resultiert.

Die Expression von peptidbeladenen MHC-I Molekülen auf der Zelloberfläche von allen kernhaltigen Zellen erfordert die Koordination von 3 essentiellen Prozessen: endogene Proteine werden im Zytosol vom Proteasom degradiert, die Peptide translozieren dann mit Hilfe des Peptidtransporters TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das endoplasmatische Retikulum (ER) und binden dort an MHC-I Moleküle, die nun zur Zelloberfläche transportiert werden. CD8⁺ T-Zellen überwachen somit fast den gesamten Organismus und eliminieren ggf. infizierte Zellen.

CTLs sind auch in der Lage Tumoren zu erkennen, da sie die Fähigkeit besitzen qualitative Unterschiede in transformierten Zellen zu registrieren (Castelli et al., 2000). Die Antigenerkennung erfolgt innerhalb einer Zone zwischen der CD8⁺ T-Zelle und der Zielzelle, der immunologischen Synapse (Janeway et al., 2008). Um infizierte Zellen zu eliminieren, induzieren CTLs die Apoptose über 3 mögliche Mechanismen. Durch die Aktivierung von Caspasen über eine Fas/Fas-Liganden Rezeptorbindung (Nagata, 1996), durch die Freisetzung der Effektorzytokine TNF α und IFN γ , oder durch die Sezernierung von zytotoxischen Effektormolekülen. IFN γ inhibiert direkt die virale Replikation, induziert die vermehrte Expression von MHC-I Molekülen auf der Zelloberfläche und aktiviert wie auch TNF α Makrophagen. TNF α ist des Weiteren in der Lage durch die Interaktion mit seinem korrespondierenden Rezeptor Apoptose zu induzieren (Janeway et al., 2008). Der prinzipielle Mechanismus der CTL-Aktivität beruht jedoch auf der Kalzium-abhängigen Sekretion von zytotoxischen Granula nach Antigenerkennung auf der Oberfläche der Zielzellen (Pores-Fernando and Zweifach, 2009). Zu den zytotoxischen Effektorproteinen zählen Perforine und Granzyme, die aus den Lysosomen nur innerhalb der immunologischen Synapse sezerniert werden, wodurch sie in sehr konzentrierter Form die infizierte Zielzelle treffen (Jenkins and Griffiths, 2010).

Die T-Zellantwort auf eine akute Infektion mit einem intrazellulären Erreger kann in 3 Phasen unterteilt werden: eine sehr starke Proliferation der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen und Differenzierung zu CTLs (klonale Expansion). Nach der Beseitigung des Erregers sterben die meisten dieser antigenspezifischen Effektorzellen (Kontraktionsphase) und nur ein geringer Anteil überlebt, der sich dann zu funktionellen reifen Gedächtniszellen entwickelt (Gedächtnisphase) (Kaeck and Cui, 2012).

1.4 Differenzierungswege von CD8⁺ T-Zellen

1.4.1 Effektorzellendifferenzierung

CD8⁺ Effektor T-Zellen können in mindestens 2 Klassen unterteilt werden; einen großen Pool an kurzlebigen Effektorzellen (*SLECs*, *short-lived effector cells*) und eine

kleine Fraktion von Gedächtnisvorläufer-Effektorzellen (*MPECs*, *memory precursor effector cells*). *SLECs* sind im Gegensatz zu *MPECs* eine terminal differenzierte Zellpopulation und sehr effizient in der Eliminierung von Infektionen. Sie sterben nach der Effektorphase ab. Im Gegensatz dazu können sich *MPECs* zu langlebigen Gedächtniszellen entwickeln und tragen somit zu einem permanenten immunologischen Schutz bei (Joshi et al., 2007). Zytokine, wie IL-12 oder Typ I Interferone (Typ I IFN), wirken während der frühen Phase der CD8⁺ T-Zellantwort als Differenzierungsfaktoren und beeinflussen somit auch die Entwicklung von *SLECs* und *MPECs* (Cox et al., 2011). Der TF TBX21 (*T-box transcription factor*) wird besonders in Effektorzellen exprimiert (Joshi et al., 2011). IL-12 induziert dosisabhängig die TBX21-Expression und fördert die Ausbildung des *SLEC*-Phänotyps, der durch die verstärkte Expression von KLRG1 (*Killer cell lectin-like receptor G1*) und die Herunterregulierung von IL7R α charakterisiert ist (Joshi et al., 2007). Weitere phänotypische Charakteristika von Effektorzellen sind die geringe Expression von CD62L und die Hochregulierung von CD44 (Kaeck and Cui, 2012). Hohe IL-2-Level fördern die Generierung von *SLECs* (Cox et al., 2011), unterdrücken die CTL-Gedächtniszellentwicklung und begünstigen die Expression von Perforin, GranzymB und IFN γ , wodurch die zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen erhöht wird (Pipkin et al., 2010). Des Weiteren führen IL-2-Signale zu einer Hochregulierung der TF BLIMP1 (*B-lymphocyte induced maturation protein 1*) und ID2 (*DNA-binding protein inhibitor 2*), die auch mit der Differenzierung und Funktion von *SLECs* assoziiert werden (Cannarile et al., 2006; Crotty et al., 2010). BLIMP1 verstärkt zytotoxische Funktionen, wie z.B. die Expression von IFN γ , GranzymB und die Migration zur Entzündungsstelle (Kallies et al., 2009; Rutishauser et al., 2009; Shin et al., 2009). In Abwesenheit von BLIMP1 werden vermehrt CD8⁺ Gedächtniszellen gebildet (Rutishauser et al., 2009). ID2 fördert das Überleben von CD8⁺ T-Zellen beim Übergang von naiven Zellen zu Effektorzellen (Cannarile et al., 2006). In *Id2*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen ist die TBX21-Expression reduziert, wodurch die Generierung von *SLECs* kaum induziert wird (Masson et al., 2013).

MPECs sind u.a. durch die verstärkte Expression der TF BCL6 (*B-cell lymphoma 6*), EOMES (*Eomesodermin*) und ID3 (Kaeck and Cui, 2012) charakterisiert. *Eomes*^{-/-} CD8⁺ Effektor T-Zellen können *MPECs* generieren, die jedoch nicht zu reifen Gedächtniszellen differenzieren (Banerjee et al., 2010). *MPECs* exprimieren kaum

KLRG1, jedoch erhöhte Mengen IL7R α und CD44 (Intlekofer et al., 2005; Kaech and Cui, 2012). CD8⁺ Gedächtniszellen besitzen die Plastizität sich nach erneutem Antigenkontakt zu *SLECs* zu entwickeln. Dies ist durch die schnelle Reaktivierung von Effektorfunktionen, die schnelle Migration in sekundäre Lymphorgane und durch ein hohes Proliferationspotential charakterisiert. Sie sind aufgrund der durch IL-7 und IL-15 vermittelten homöostatischen Proliferation auch ohne Antigenkontakt langlebig (Wherry, 2011).

Es gibt verschiedene Theorien zu welchem Zeitpunkt entschieden wird, wann und wie sich CD8⁺ Gedächtniszellen nach der Infektion bilden. Eine Vorstellung ist, dass die erste T-Zellteilung asymmetrisch verläuft, wobei eine Tochterzelle das Gedächtniszellpotential erhält, die andere das Effektorzellpotential. Dieses Model postuliert, dass die Entwicklung mit der ersten Zellteilung festgelegt ist (Chang et al., 2007). In einer anderen Studie wird davon ausgegangen, dass die Stärke der Infektion, des CD8⁺ T-Zell *primings*, ein entscheidender Faktor bei der *SLEC*- und *MPEC*-Entwicklung ist. Dabei wird angenommen, dass die Menge der IL-12-Expression die *SLEC*-Entwicklung positiv beeinflusst (Joshi et al., 2007). Abb.1.1 verdeutlicht schematisch die Effektorzelldifferenzierung der CD8⁺ T-Zellen.

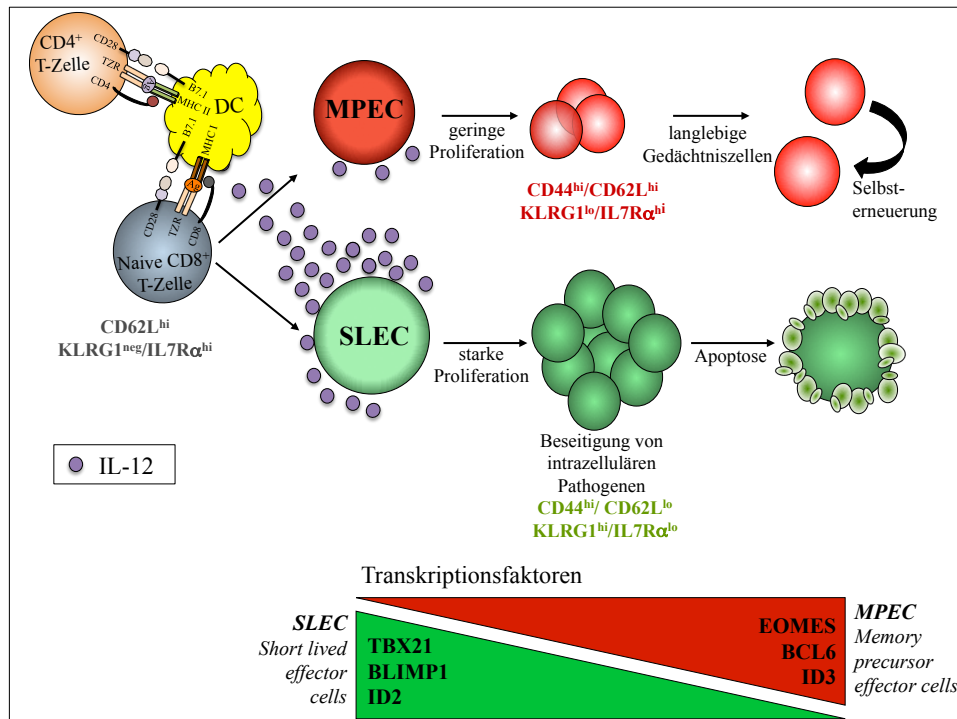


Abb. 1. 1 Schema der SLEC- und MPEC-Entwicklung während einer Infektion. Die naive CD8⁺ T-Zelle erkennt ihr Antigen, welches durch APZs wie DC präsentiert wird. Nach Aktivierung der CD8⁺ T-Zelle durch DCs und CD4⁺ T-Zellen erfolgt die Differenzierung in kurzlebige Effektorzellen (*SLEC*) oder in Gedächtnisvorläufer-Effektorzellen (*MPEC*). Das von den DCs sezernierte IL-12 fördert die Bildung von *SLECs*, die daraufhin stark proliferieren und nach Beseitigung der Infektion in Apoptose gehen. Die *MPECs* hingegen proliferieren weniger stark und entwickeln sich nach der Infektion zu langlebigen Gedächtniszellen, die das Potential zur Selbsterneuerung besitzen. Phänotypische Charakteristika der *SLECs* sind die starke Expression von CD44 und KLRG1 während die Expression von CD62L und IL7Rα herunterreguliert ist. Im Gegensatz dazu ist die Hochregulierung von CD44, CD62L und IL7Rα und die Herunterregulierung von KLRG1 charakteristisch für *MPECs*. Die Entwicklung der *SLECs* und *MPECs* wird auch durch die Expression von bestimmten TFs bestimmt. In *SLECs* werden vornehmlich TBX21, BLIMP1 und ID2 exprimiert. In *MPECs* werden EOMES, BCL6 und ID3 verstärkt exprimiert.

1.4.2 Zustand der Erschöpfung

Während einer Infektion können aktivierte CD8⁺ T-Zellen auch in den Zustand der Erschöpfung übergehen. Dieser Zustand beschreibt eine weitere Form der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen, die während chronischer Infektionen oder bei Krebserkrankungen auftritt (Wherry, 2011). Die Erschöpfung ist durch eine eingeschränkte Effektorfunktion und die anhaltende Expression von inhibitorischen Rezeptoren definiert. CD8⁺ T-Zellen, die kaum Zytokine produzieren, wurden erstmals während einer chronischen Infektion mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) als sogenannte erschöpfte Zellen identifiziert (Zajac et al., 1998). Bei der Erschöpfung gehen die meisten Zellen im Verlauf der Zeit in Apoptose (Speiser et al., 2014). Bei den verbleibenden T-Zellen kann das Effektorpotential z.B. durch die

Blockierung von inhibitorischen Rezeptoren reaktiviert werden (Speiser et al., 2014). Je höher und länger anhaltend jedoch die Pathogenlast, desto stärker ist die CD8⁺ T-Zellerschöpfung (Wherry et al., 2003a). Sie ist Teil eines aktiven negativ regulatorischen Prozesses und nicht auf einen passiven, intrinsischen Defekt, eine Infektion zu erkennen und zu bekämpfen, zurückzuführen (Doering et al., 2012). Zu diesen regulatorischen Prozessen gehören immunmodulatorische Zytokine (z.B. IL-10), inhibitorische Rezeptoren auf der Zelloberfläche wie z.B. PD-1 (*Programmed cell death 1*) und LAG-3 (*Lymphocyte activation-gene 3*) und immunoregulatorische Zelltypen (z.B. T regulatorische T-Zellen (Tregs)) (Wherry, 2011). Die Interaktion von PD-1 mit seinem Liganden PD-1L oder PD-2L reguliert die CD8⁺ T-Zellantwort herunter, indem die Aktivierung, Expansion und die Effektorfunktionen der pathogenspezifischen CD8⁺ T-Zellen inhibiert wird (Barber et al., 2006). PD-1 und LAG-3 vermitteln dabei kooperativ die Dysfunktion der T-Zellen, die durch eine duale Blockierung dieser Rezeptoren aufgehoben werden kann (Nguyen and Ohashi, 2015; Sakuishi et al., 2010). Erschöpfte CD8⁺ T-Zellen exprimieren zudem ein TF-Profil, das sich von funktionellen Effektorzellen und Gedächtniszellen fundamental unterscheidet (Doering et al., 2012; Kao et al., 2011; Wherry, 2011; Wherry et al., 2007). So wird z.B. TBX21 in erschöpften CD8⁺ T-Zellen nur sehr schwach exprimiert, während funktionelle Effektorzellen eine erhöhte TBX21-Expression aufweisen. In erschöpften CD8⁺ T-Zellen korreliert die TBX21-Expression invers mit der PD-1-Expression. Dabei reguliert TBX21 die CD8⁺ T-Zellerschöpfung besonders durch die Repression von PD-1 über die Bindung der regulatorischen Region *upstream* von *Pdcd1*, dem für PD-1 kodierenden Gen (Kao et al., 2011). Obwohl erschöpfte CD8⁺ T-Zellen nicht zu konventionellen Gedächtniszellen differenzieren können (Wherry et al., 2007), können sie bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Ag expandieren. Sie behalten jedoch die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von erschöpften Zellen (Utzschneider et al., 2013), s. Abb.1.2. Der Zustand der Erschöpfung ist mit einem anhaltenden Aktivierungsprogramm assoziiert, dass sich von dem Effektorprogramm unterscheidet (Doering et al., 2012) und kann somit als eigener Differenzierungszustand charakterisiert werden (Utzschneider et al., 2013).

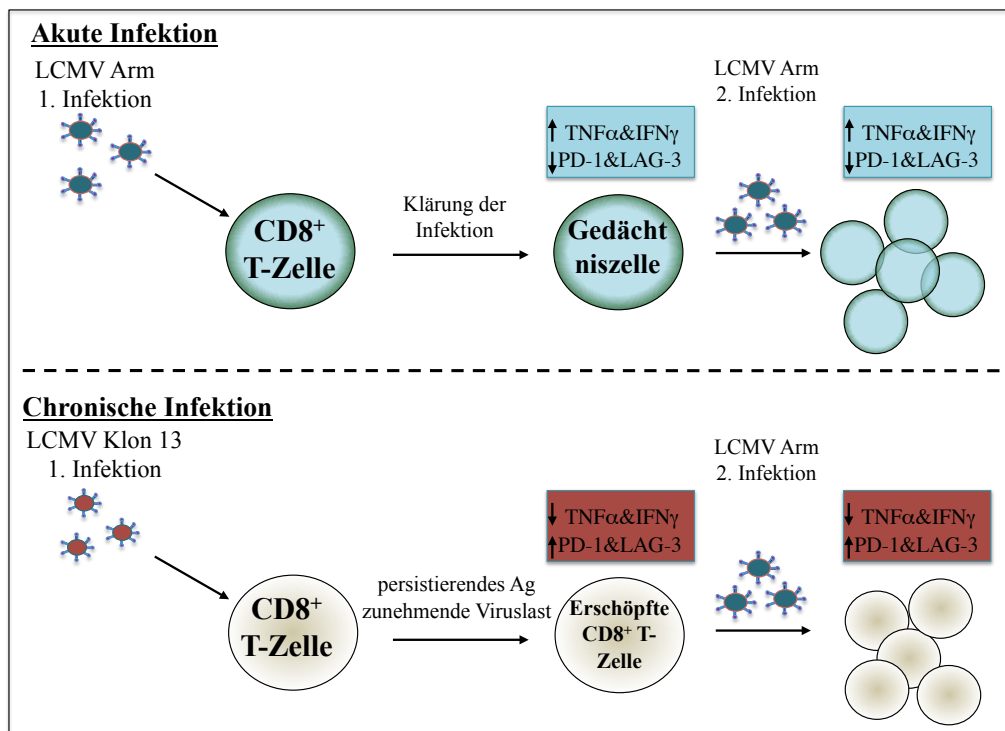


Abb. 1. 2 T-Zelldifferenzierung während einer akuten und chronischen Infektion. Entwicklung von LCMV spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach einer akuten LCMV Arm-Infektion (oben) bzw. chronischen LCMV Klon13-Infektion (unten). Werden diese Zellen wieder einer akuten LCMV Arm-Infektion ausgesetzt, bleibt der erschöpfte Phänotyp, der während der chronischen LCMV Klon 13-Infektion erworben wurde, trotz einer starken Expansion der spezifischen CD8⁺ T-Zellen weiterhin bestehen. Die IFNγ- und TNFα-Produktion ist stark verringert und die inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und LAG-3 sind weiterhin hochreguliert, im Gegensatz zu den Gedächtniszellen, die nach einer akuten LCMV Arm-Infektion generiert werden.

1.5 Die Transkriptionsfaktorfamilie der Interferon regulierenden Faktoren (IRFs)

Die Familie der Interferon regulierenden Faktoren (IRF) wurde nach der Funktion des ersten identifizierten Mitglieds IRF1 benannt. IRFs binden an IFN-*stimulated response element* (ISRE), ein DNA-Motiv, das sich u.a. im Promotor von Genen befindet, die durch Typ I IFN reguliert werden (Lohoff and Mak, 2005). Die IRF-Familie besteht aus 9 Mitgliedern; IRF1-IRF9. Alle Mitglieder sind durch eine konservierte Amino (N)-terminale DNA-Bindungsdomäne (DBD) mit 5 Tryptophanwiederholungen charakterisiert. Die DBD bildet eine Helix-*turn*-Helix-Domäne und erkennt ähnliche DNA-Sequenzen. Die Erkennungssequenz des Helix-*turn*-Helix-Motivs der IRFs ist 5'-AANNGAAA-3', dabei ist die 5'-AA-Sequenz entscheidend für die Erkennung durch die IRFs, denn sie binden z.B. nicht an die NFκB-Bindungsstelle, die ebenfalls als Kernsequenz GAAA enthält, aber nicht von

einer 5'-AA-Sequenz flankiert wird (Fujii et al., 1999). Der Carboxyl (C)-Terminus der IRFs besitzt eine IRF-Assoziationsdomäne (IAD) die verantwortlich ist, für die homo- und heterodimeren Interaktionen mit anderen IRF-Mitgliedern oder TF wie z.B. PU.1 oder Signal Transduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs) (Tamura et al., 2008). IRFs beeinflussen u.a. die Funktion von APZs, den Zellzyklus und sind involviert in die Differenzierung der T-Zellen (Lohoff and Mak, 2005).

1.5.1 Der Transkriptionsfaktor Interferon regulierender Faktor 4 (IRF4)

IRF4 kommt u.a. in hämatopoetischen Zellen vor und seine Expression kann z.B. durch die Stimulation des TZRs induziert und durch die Zytokine IL-4 und IL-21 positiv beeinflusst werden (Huber and Lohoff, 2014). In Abhängigkeit von seinen DNA-Bindungspartnern kann IRF4 die Genexpression aktivieren oder reprimieren (Lohoff and Mak, 2005).

IRF4 ist essentiell bei der Differenzierung der Th-Zellsubtypen Th2, Th9, Th17 und follikulären Th-Zellen (Tfh). So fördert IRF4 die Th2-Differenzierung durch die Interaktion von NFATc2 (*Nuclear factor of activated T cells*), wodurch der Masterregulator GATA3 hochreguliert und die IL-4-Produktion induziert wird (Lohoff et al., 2002; Rengarajan et al., 2002). Bei Th17-Zellen wird IRF4 für die IL-17-Produktion benötigt, wodurch diese Zellen in die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie z.B. EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) involviert sind (Brüstle et al., 2007). In Th9-Zellen reguliert IRF4 die IL-9-Produktion positiv durch Bindung an den *Il-9*-Promoter (Staudt et al., 2010). Bei Tfh-Zellen ist IRF4 essentiell für die Interaktion zwischen T- und B-Zellen während der adaptiven Immunantwort (Bollig et al., 2012). Des Weiteren ist IRF4 entscheidend für die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu Tc9-Zellen, die Th2-vermittelte Atemwegsentzündungen verstärken (Viscruina et al., 2013) und Tc17-Zellen, die eine Induktion der Th17-vermittelten EAE fördern (Huber et al., 2013). Weiterhin wurde gezeigt, dass *Irf4*^{-/-} CTLs nach einer LCMV-Infektion keine zytotoxische Aktivität aufweisen (Mittrücker et al., 1997).

Die transkriptionelle Regulation erfolgt durch die Bindung von TF an regulatorische DNA-Elemente. Dabei stabilisieren Protein-Protein- und DNA-Protein-Interaktionen die Bildung von Komplexen, die an die *enhancer*-Regionen von Genen binden. Es

konnte gezeigt werden, dass in B-Zellen, DCs und Makrophagen eine Interaktion zwischen IRF4 und TF der ETS-Familie (*E-twenty six*) stattfindet; sie binden kooperativ an EICE-Motive (ETS- IRF *composite elements*) der DNA (Brass et al., 1996; Glasmacher et al., 2012). T-Zellen exprimieren jedoch nur geringe Mengen der ETS-Faktoren, weshalb die Bildung dieser Komplexe unwahrscheinlich ist. Aufgrund einer geringen Bindungsaffinität, setzt die Aktivität von IRF4 in CD4⁺ T-Zellen die Interaktion mit anderen TF voraus (Brass et al., 1996). ChIP-Seq-Analysen identifizierten BATF (*Basic leucine zipper transcription factor ATF-like*)-JUN Heterodimere als kooperative Bindungspartner für IRF4 in CD4⁺ T-Zellen, die als IRF4-BATF-JUN-Komplexe AICE-Motive (AP-1-IRF *composite elements*) der DNA binden (Ciofani et al., 2012; Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012), s. Abb.1.3. Die BATF-IRF4-Interaktion reguliert die Differenzierung von Th17-Zellen indem sie die Chromatinöffnung fördert, wodurch die DNA-Bindung von zellspezifischen TF ermöglicht wird (Ciofani et al., 2012). Auch für die Treg- und CD8⁺ T-Zelldifferenzierung ist die Interaktion zwischen BATF und IRF4 von großer Bedeutung bei der Regulation der Genexpression (Kurachi et al., 2014; Vasanthakumar et al., 2015).

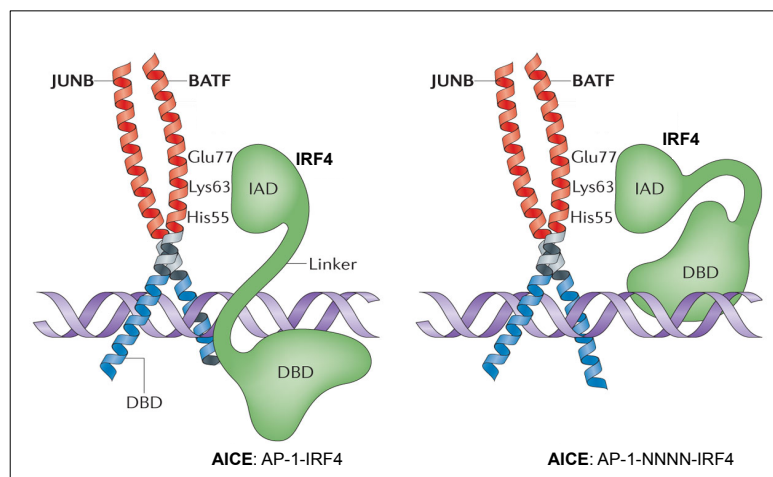


Abb. 1. 3 Die Interaktion von BATF und IRF4 an AICE-Motiven. BATF-JUNB Heterodimere und IRF4 binden an 2 Arten der AP-1-IRF *composite elements* (AICE) der DNA, entweder mit benachbarten AP-1-IRF4-Konsensussequenzen (links) oder mit AP-1-IRF4-Konsensussequenzen, die durch 4 Nukleotide (NNNN) voneinander getrennt sind (rechts). Die Aminosäurereste an der äußeren Seite des BATF Leucin-Zipper-Motivs (His55, Lys63 und Glu77) sind für die Interaktion von BATF mit IRF4 von besonderer Bedeutung. Modifiziert nach Murphy et al., 2013.

1.5.2 Der Transkriptionsfaktor Interferon regulierender Faktor 9 (IRF9)

IRF9 wird konstitutiv in fast allen Zellen des Organismus exprimiert und wurde als eine Untereinheit des IFN stimulierenden Genfaktor 3 (ISGF3)-Komplexes identifiziert (Darnell et al., 1994). Bei der virusinduzierten Typ I IFN-Produktion durch plasmazytoide DCs (pDCs) sind die endosomalen *Toll like* Rezeptoren (TLRs) 7 und 9, Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (PRRs *pattern recognition receptor*), essentiell. Virale Einzelstrang RNA (ss RNA) wird durch TLR 7 erkannt, woraufhin das Adaptermolekül MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) zum TLR rekrutiert wird und einen Komplex mit IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*)-1, TRAF (*TNF receptor associated factor*) 3, TRAF6, IKK (*I κ B kinase*)- α und IRF7 bildet. IRF7 wird phosphoryliert, homodimerisiert daraufhin und transloziert in den Kern, um die Genexpression von Typ I IFN zu aktivieren (Takeuchi and Akira, 2010). Durch die Bindung von Typ I IFN an ihren ubiquitär exprimierten Oberflächenrezeptor Typ I IFN-Rezeptor (IFNAR) werden STAT-Proteine rekrutiert und aktiviert. Daraufhin bilden sie Dimere und translozieren in den Kern. Es werden überwiegend 3 STAT-Komplexe gebildet, die unterschiedliche Genexpressionsprogramme kontrollieren. Der STAT1 Homodimer-Komplex bindet an Gamma-aktivierende-Sequenzen (GAS) und induziert so die Expression von proinflammatorischen Genen, während der STAT3 Homodimer-Komplex die Expression von proinflammatorischen Genen indirekt, durch die Bindung an GAS-Sequenzen, supprimiert. Bei der kanonischen Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade bilden STAT1 und 2 zusammen mit IRF9 den ISGF3-Komplex, der an ISRE bindet und somit die Transkription von klassischen antiviralen Genen aktiviert (ISG) (Ivashkiv and Donlin, 2014). Die Interaktion mit der ISRE-Kernsequenz wird dabei durch IRF9 vermittelt (Terawaki et al., 2011). Die Abbildung 1.4 verdeutlicht schematisch die Aktivierung von IRF9.

Es konnte gezeigt werden, dass STAT1 bei LCMV-Infektionen protektiv wirkt, indem es die lethale CD4⁺ T-Zell-vermittelte Organschädigung verhindert (Hofer et al., 2012). Für Listerieninfektionen wurde gezeigt, dass STAT1 in DCs und T-Zellen die sekundäre Immunantwort positiv beeinflusst (Kernbauer et al., 2012). *Stat2*^{-/-} Mäuse sind sehr anfällig gegenüber viralen Infektionen (Hofer et al., 2012; Park et al., 2000). Sie reagieren nur schwach auf Typ I IFN (Park et al., 2000) und weisen eine defekte

DC-Entwicklung auf (Chen et al., 2009), die durch STAT2-abhängige, aber STAT1-unabhängige Signalwege bedingt ist (Hahm et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei der Typ I IFN- und der antiviralen CD8⁺ T-Zellantwort die kooperative DNA-Bindung von STAT1 eine untergeordnete Rolle spielt (Begitt et al., 2014). ISG-Expressionsanalysen weisen daraufhin, dass STAT2 und IRF9 auch unabhängig von STAT1 wirken, da z.B. die Expression von *Irf7* in LCMV-infizierten Mäusen STAT2-abhängig und STAT1-unabhängig erfolgt (Hahm et al., 2005).

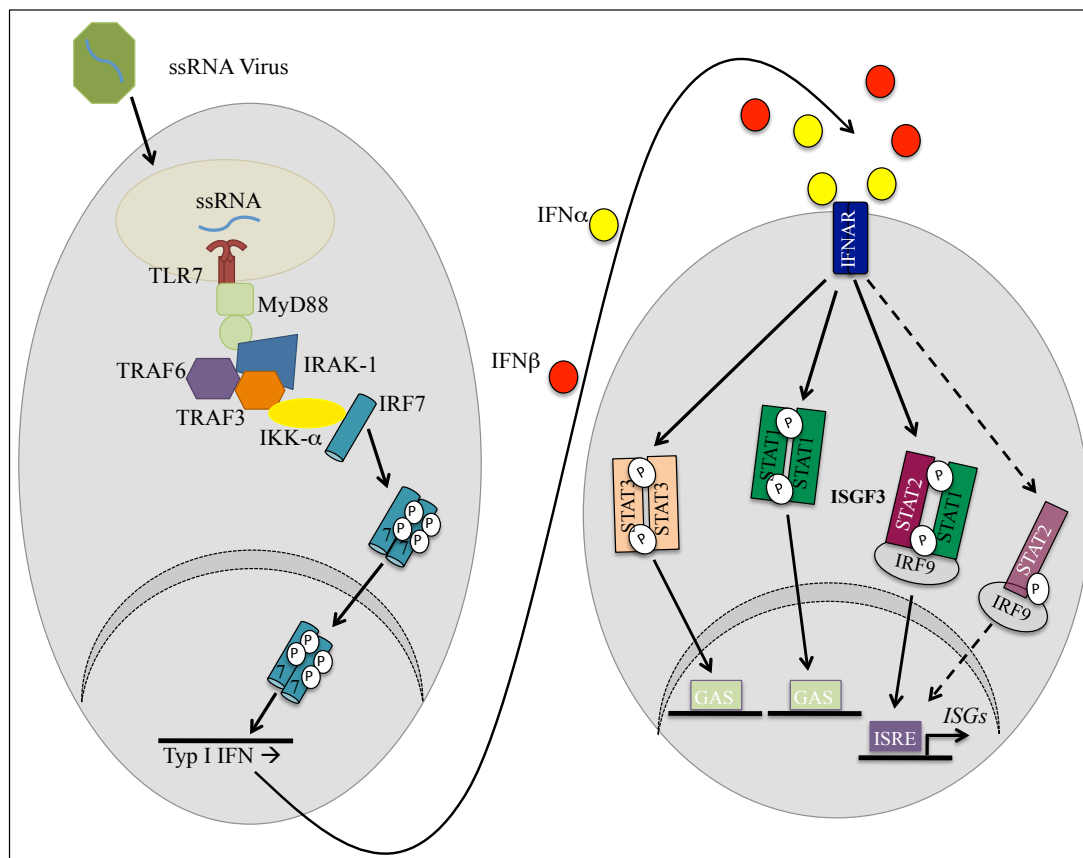


Abb. 1. 4 IRF9 Aktivierung während einer viralen Infektion. Der endosomale Rezeptor TLR 7 erkennt in pDCs endozytierte ssRNA. Daraufhin wird das Adaptermolekül MyD88 zum TLR rekrutiert und bildet einen Komplex mit IRAK-1, TRAF3, TRAF6, IKK- α und IRF7. IRF7 wird phosphoryliert, homodimerisiert und transloziert in den Kern, um die Genexpression von Typ I IFN zu aktivieren. Sekretisiertes IFN α und IFN β stimuliert IFNAR und in der Folge können 3 STAT-Komplexe gebildet werden, die unterschiedliche Genexpressionsprogramme kontrollieren. STAT1 Homodimere binden an GAS-Sequenzen und können die Transkription von proinflammatorischen Genen aktivieren, während die Bindung von STAT3 an GAS-Sequenzen die Transkription von proinflammatorischen Genen supprimiert. ISGF3, ein Heterotrimer bestehend aus STAT1/2 und IRF9 aktiviert durch die Bindung an ISRE im Promotor von ISGs deren Transkription. Es ist denkbar, dass ein Komplex der nur aus STAT2 und IRF9 besteht, auch die Transkription von ISGs induziert. Modifiziert nach Takeuchi und Akira, 2010 und Ivashiv und Donlin, 2014.

1.6 Tierexperimentelle Versuchsmodelle zum Studium der CD8⁺ T-Zellantwort

1.6.1 Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) ist ein gram-positives fakultativ intrazelluläres Bakterium mit peritricher Begeißelung. Das Wachstumsoptimum liegt bei 30-37°C. Sie sind jedoch auch noch bei 4°C wachstums- und überlebensfähig (Glaser et al., 2001). Listerien können bei Menschen und Tieren die Infektionskrankheit Listeriose verursachen, wobei nur *L. monocytogenes* als humanpathogen angesehen wird (Vázquez-Boland et al., 2001). Besonders immunsupprimierte Menschen und Schwangere im dritten Trimester sind gefährdet (Cossart, 2007; Hof et al., 2007).

In der immunologischen Forschung findet *L. monocytogenes* Verwendung, da es sehr gut charakterisiert ist und leicht im Mausmodell genutzt werden kann (Pamer, 2004). Natürlicherweise wird *L. monocytogenes* über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen. Die Oberflächenproteine InternalinA und B (InlA und InlB) ermöglichen es Listerien über Interaktion mit den Cadherin-Transmembranproteinen in Darmepithelzellen des Wirts einzudringen (Shen et al., 2000). Über den Blutstrom gelangen sie in die Milz und Leber, wo sie von Makrophagen aufgenommen werden. Im Phagosom der Makrophagen sezernieren sie Listeriolysin O (LLO) mit dessen Hilfe sie die phagosomale Membran zerstören können und in das Zytosol eindringen. Mit Hilfe des *actin-assembly-inducing proteins* (ActA) kann sich das Bakterium im Zytosol fortbewegen und durch Ausstülpung der Zellmembran, kann es in angrenzende Zellen eindringen (Domann et al., 1992; Kocks et al., 1992). Nach der Abschnürung entsteht eine zweite Vakuole. Um der zweiten Vakuole in der neu eingedrungenen Zelle zu entkommen, sezerniert *L. monocytogenes* die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase (PlcB) und LLO, wodurch wiederum die Phagosomenmembran abgebaut wird und *L. monocytogenes*, den Extrazellularraum umgehend, sich im Gewebe ausbreitet (Pamer, 2004).

Eine frühzeitige Abwehr von *L. monocytogenes* ist besonders durch die Produktion von IFN γ durch Natürliche Killerzellen (NK Zellen) bedingt, wodurch es zu einer Aktivierung von Makrophagen kommt. Auch TNF α ist von besonderer Bedeutung für

die primäre Abwehr gegen eine Infektion mit *L. monocytogenes* (Tripp et al., 1993). Die Eliminierung einer Listerieninfektion wird vor allem durch CD8⁺ T-Zellen und Th1-Zellen vermittelt (McGregor et al., 1970).

1.6.2 Lymphozytäres Choriomeningitis Virus (LCMV)

Die Lymphozytäre Choriomeningitis (LCM) ist eine durch LCMV ausgelöste virale Infektionskrankheit, von der hauptsächlich Nagetiere betroffen sind, die aber auch Menschen betreffen kann. LCMV ist ein nichtlytisches negativ Einzelstrang RNA-Virus der Gattung Arenavirus, das sich ubiquitär in allen Organen, auch in lymphatischem Gewebe und im Zentralnervensystem replizieren kann (Fazakerley et al., 1991). Die Verwendung von LCMV als Modellpathogen ermöglichte die Entdeckung von vielen Schlüsselkonzepten. So konnte demonstriert werden, dass LCMV die Fähigkeit besitzt lebenslang im Wirt zu persistieren (Traub, 1936) und somit eine chronische Erkrankung verursachen kann. Des Weiteren wurde mit Hilfe dieses Virusmodells die MHC-Restriktion von CD8⁺ T-Zellen beschrieben (Zinkernagel and Doherty, 1974) und die Bildung von hoch potenten CD8⁺ Gedächtniszellen konnte nachgewiesen werden (Lau et al., 1994; Sallusto et al., 1999; Wherry et al., 2003b). Auch die Definition der T-Zellerschöpfung wurde durch LCMV ermöglicht (Barber et al., 2006; Wherry et al., 2007).

Die Stärke einer LCMV-Infektion in der Maus ist abhängig vom Virusstamm und der Infektionsroute (Khanolkar et al., 2002). Man kann u.a. zwischen LCMV Armstrong (LCMV Arm), der eine akute Infektion verursacht, und LCMV Klon 13, der eine chronische Infektion verursacht, unterscheiden. Die Kontrolle der LCMV-Infektion ist initial abhängig von Typ I IFN, die zu Beginn einer Infektion hauptsächlich von pDCs sezerniert werden (Takeuchi and Akira, 2010). Eine akute LCMV-Infektion induziert eine massive Expansion und Aktivierung von virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen, die entscheidend bei der Viruseliminierung sind, jedoch auch eine letale Immunpathologie vermitteln können (Moseman and McGavern, 2013). Die CD8⁺ T-Zellantwort gegen LCMV ist sehr robust und fokussiert, wodurch sie besonders gut in der Forschung Anwendung findet (Zhou et al., 2012).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Mitglieder der IRF-Familie sind im Zusammenspiel miteinander und mit anderen TF an der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt. So ist bekannt, dass die Zytokinproduktion und Differenzierung von CD4⁺- und einigen CD8⁺ T-Zell-Subtypen in Abhängigkeit von IRF4 erfolgt (Huber and Lohoff, 2014). Auch die Plasmazelldifferenzierung der B-Zellen wird von IRF4 beeinflusst. Welche Bedeutung IRF4 für die Differenzierung von funktionellen CD8⁺ Effektor T-Zellen besitzt, ist noch nicht vollständig beschrieben. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen aus *Irf4*^{-/-} Mäusen keine funktionelle Effektorantwort gegen virusinfizierte Zellen nach einer LCMV-Infektion aufweisen (Mittrücker et al., 1997).

IRF9 bildet zusammen mit STAT1 und 2 den trimolekularen ISGF3-Komplex, der einen der möglichen Signalwege bei der Typ I IFN vermittelten Immunantwort induziert und die Expression von antiviralen Genen aktiviert. Ob IRF9 dabei die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen beeinflusst ist bislang nicht bekannt. *Ifnar*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen weisen keine veränderte Expression von Aktivierungsmarkern auf und sie können Effektorfunktionen erwerben (Aichele et al., 2006). Im Gegensatz dazu zeigen *Stat1*^{-/-} und *Stat2*^{-/-} Mäuse eine hohe Anfälligkeit gegenüber viralen Infektionen (Chen et al., 2009; Hahm et al., 2005; Hofer et al., 2012; Kernbauer et al., 2012; Park et al., 2000).

Die Klärung von Listerieninfektionen ist abhängig von CD8⁺ T-Zellen. Daher soll im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Funktion von IRF4 in CD8⁺ Effektor T-Zellen mit Hilfe des murinen Listerieninfektionsmodells genauer analysiert werden. Unter Verwendung von *Irf4*^{-/-} Mäusen und Transferversuchen soll der Mechanismus der Differenzierung in CD8⁺ kurzlebige Effektor und langlebige Gedächtnis T-Zellen besser verstanden werden.

Im zweiten Teil soll anhand des murinen LCMV-Modells die Bildung von Typ I IFN induziert werden, wodurch der ISGF3-Komplex und virusspezifische CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden. Unter Verwendung von *Irf9*^{-/-} Mäusen soll untersucht und verstanden werden, ob die antivirale CD8⁺ T-Zellantwort in Abhängigkeit von IRF9 erfolgt.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Laborzubehör

Geräte	Hersteller
37°C CO ₂ -Zellkulturschrank	Heraeus
Analysewaagen	Sartorius AG
Blotapparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bioruptor™ UCD-200	Diagenode Inc.
BD FACSAria™ III	BD Biosciences
BD FACSCalibur™	BD Biosciences
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences
FACS-Röhrchen 5ml	Sarstedt AG & Co
Flüssigprobenbeutel	Nasco Wisconsin
Heizblock	Roth GmbH & Co KG
Kanülen (19G x ½, 26G x ½)	BD Bioscience
Magnetische Beads	Eigene Herstellung
Micro Chemie	biostep GmbH
Mikrowelle	Sharp
Neubauer Zählkammer	BRAND GmbH & Co KG
Pasteurpipetten	BRAND GmbH & Co KG
Petrischalen (10 cm), unbeschichtet	Greiner Bio-One GmbH und Sarstedt AG & Co
Petrischalen (10 cm) beschichtet für Zellkultur	BD Bioscience
Pipetten	Eppendorf AG
Power Supply	Scie-Plas Ltd.
Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF)	F. Hoffmann-La Roche AG
Reaktionsgefäße (50 ml, 15 ml, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)	Eppendorf AG, Greiner Bio-One GmbH, Sarstedt AG & Co
Rotorgene	Qiagen

Geräte	Hersteller
SDS-PAGE-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Schüttler	IKA
Sicherheitswerkbank	Heraeus
Spritzen 1 ml	BD Bioscience
Sterilfilter (0,22 µm)	Sarstedt AG & Co
StepOnePlus™	Applied Biosystems
Whatman® Filterpapier	GE Healthcare Europe GmbH
Zellkultur-Platten (6-, 12-, 24-, 48-well Flachboden, 96-well-Rundboden)	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH
Zellsiebe Falcon® (70 und 100 µm)	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugen: Biofuge Stratos (Rotor 3331), Multifuge 1L-R (Rotor 75002000) Megafuge 1.0 R (Rotor 2704)	Heraeus

2.2 Reaktionskits

Bezeichnung	Firma
FAST SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystem
Foxp3/ Transcription factor Staining Buffer Set	eBioscience
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostic GmbH
Maxima™ First strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
RNeasy Micro Kit	Qiagen
Quanti Tect™ SYBR Green PCR Kit	Qiagen
QIAquick®PCR Purification Kit	Qiagen

2.3 Chemikalien

Substanz	Firma
<i>100x MEM Non essential Amino Acids</i>	PAA Laboratories GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG
BCA TM Protein Assay Reagenz A und B	Thermo Fisher Scientific
Biotinierte microBeads	Institut für medizinische Mikrobiologie, Marburg
Bovines Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
BrefeldinA	Sigma-Aldrich
CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Merck KGaA
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Formaldehyd 36,5%	Sigma-Aldrich
Glycin	Riedel-de Häen
Glykoprotein ₃₃₋₄₁ (GP ₃₃₋₄₁)	Metabion international AG
Instamed HANK's Salz Trockensubstanz (BSS)	Biochrom GmbH
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Roth GmbH & Co KG
L-Glutamin	Biochrom GmbH
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck KGaA
β-Mercaptoethanol (ME)	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth GmbH & Co KG
N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich

Substanz	Firma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich
Nonident ® P-40	Sigma-Aldrich
Nukleoprotein ₃₉₆₋₄₀₄ (NP ₃₉₆₋₄₀₄)	Metabion international AG
Penicillin G	Biochrom GmbH
Percoll (Easycoll Separation Solution, Dichte 1,124 G/ML)	Biochrom GmbH
Phosphate buffered saline (PBS) Trockensubstanz	Biochrom GmbH
Piperazin-N,N'-bis-(2ethansulfonsäure) (PIPES)	Roth GmbH & Co KG
Protease Inhibitoren Single-Use Cocktail (100x)	Thermo Fisher Scientific
Protein A Sepharose 4Fast Flow	GE Healthcare Europe GmbH
Protein G Sepharose 4Fast Flow	GE Healthcare Europe GmbH
Proteinase K	Qiagen
Quanti Tect SYBR® Green	Qiagen
Ripa Puffer	Sigma-Aldrich
Rotiphorese® Gel30	Roth GmbH & Co KG
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich
Saponin	Sigma-Aldrich
SIINFEKL	Metabion international AG
Streptavidin	Promega GmbH
Streptomycin	Biochrom GmbH
Super Signal® West Femto Maximum SensitivitySubstrate	Thermo Fisher Scientific
Tris	Roth GmbH & Co KG
Tris-Base	Roth GmbH & Co KG
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich

Substanz	Firma
Trypanblau	Gibco® life technologies
Tween 20	Merck KGaA
TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>) Agar Platten	Eigene Herstellung

2.4 Medien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung
<i>Balanced Salts Solution</i> (BSS)	BSS-Trockensubstanz in H ₂ O lösen 17 mM NaHCO ₃ 10 mM HEPES pH 7,2
<i>Coating</i> -Puffer für Zellkultur	50 mM Tris-Base pH 9,5
Elutionspuffer (ChIP)	1% SDS (w/v) 0,1 M NaHCO ₃
Lyse-Puffer I (ChIP)	5 mM PIPES (pH 8) 85 mM KCl 0,5% Nonident® P-40[v/v]
Lyse-Puffer II (ChIP)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl, 1% Nonident® P-40[v/v] 1% Natriumdeoxycholat [w/v] 1 mM EDTA
Lyse-Puffer zur Erythrozytenlyse	0,17 M NH ₄ Cl 20 mM HEPES
MACS-Puffer	PBS 0,5% BSA [w/v] 2 mM EDTA

Medium/Puffer	Zusammensetzung
Protein 4x Ladepuffer	125 mM Tris/HCl (pH 6,8) 2 ml 10% SDS [w/v] 0,5 ml Glycerol 5,25 ml Aqua dest 0,5 ml β -Mercaptoethanol Kleine Spatelspitze Bromphenolblau →aliqu., Lagerung bei -20°C oder 4°C
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	PBS-Trockensubstanz in H ₂ O pH 7,2
Protease-Inhibitor-Cocktail	Ripa-Puffer 1x <i>Halt™ Protease Inhibitor Single Use Cocktail</i> 5 mM EDTA
RPMI-1640 Vollmedium	RPMI 1640 10% FCS (v/v) 2 mM L-Glutamin 0,05 mM β -Mercaptoethanol 1x MEM <i>Non essential Amino Acids</i> + 60 ml/L Penicillin + 100 mg/L-Streptomycin
Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl pH 6,8
Saponin-Puffer	PBS 0,3% Saponin (w/v) 2% FCS (v/v)
Solution A (Chemilumineszenz)	200 ml 0,1M Tris-HCl (pH 8,6), 50mg Luminol
Solution B (Chemilumineszenz)	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure, 10 ml DMSO

Medium/Puffer	Zusammensetzung
TE-Puffer (ChIP)	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/Base (pH 8,8)
Waschpuffer I (ChIP)	20 mM Tris/HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1 % SDS [w/v] 1 % Triton™ X-100 [v/v]
Waschpuffer II (ChIP)	20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% SDS [w/v] 1% Triton™ X-100 [v/v]
Waschpuffer III (ChIP)	10 mM Tris-HCl pH 8 1% Nonident® P-40[v/v], 1% Sodiumdeoxycholat, 1 mM EDTA 0,25 M LiCl
Western Blot Blockpuffer	5% BSA 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,05% Tween 20 (v/v) mit/ohne 0,02% NaN ₃ (w/v)
Western Blot Waschpuffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,05% Tween 20 (v/v)
Western Blot Laufpuffer	200 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS (w/v)

Medium/Puffer	Zusammensetzung
Western Blot Transferpuffer	200 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS (w/v) 20% Methanol (v/v)

2.5 Antikörper und Zytokine

2.5.1 Unkonjugierte Antikörper

Antikörper	Erkannte Spezies	Klon	Herkunft
α -CD3	Maus	145.2c-11	Herstellung in der eigenen Arbeitsgruppe
α -CD28	Maus	37.51	Herstellung in der eigenen Arbeitsgruppe

2.5.2 Konjugierte Antikörper für FACS-Analysen

Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Klon	Hersteller
α -CD8 α	PE	1:500	53-6.7	eBioscience
α -CD62L	PE	1:1000	MEL-14	BD Bioscience
α -GranB	PE	1:500	16G6	eBioscience
α -IL2	PE	1:500	JES6-5H4	eBioscience
α -IL7R α	PE	1:500	SB/199	eBioscience
α -IFN γ	PE	1:500	XMG1.2	eBioscience
α -KLRG1	PE	1:500	2F1	eBioscience
α -LAG-3	PE	1:500	C9B7W	BD Bioscience
α -PD-1	PE	1:500	J43	eBioscience
α -TNF α	PE	1:500	MP6- XT22	eBioscience
α -CD8 α	APC	1:500	53-6.7	eBioscience
α -IL2	APC	1:400	JES6-5H4	eBioscience

Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Klon	Hersteller
α -IFN γ	APC	1:500	XMG1.2	eBioscience
α -KLRG1	APC	1:500	2F1	eBioscience
α -CD8 α	PerCP-Cy TM 5.5	1:500	53-6.7	BD Bioscience
α -CD45.1	PerCP-Cy TM 5.5	1:1.000	A20	eBioscience
α -IFN γ	PerCP-Cy TM 5.5	1:300	XMG1.2	BioLegend
α -B220	FITC	1:500	RA-3-6B2	eBioscience
α -CD4	FITC	1:500	GK1.5	eBioscience
α -CD8a	FITC	1:500	53-6.7	BD Bioscience
α -CD11b	FITC	1:500	M1/70	eBioscience
α -CD11c	FITC	1:500	N418	eBioscience
α -CD44	FITC	1:300	IM7	BioLegend
α -CD49b	FITC	1:500	DX5	eBioscience
α -IL7R α	FITC	1:300	LG.3A10	BioLegend
α -MHC-II (I-A/I-E)	FITC	1:500	M5/114.15.2	eBioscience
α -TNF α	FITC	1:300	MP6- XT22	eBioscience
α -Ter119	FITC	1:500	TER-119	eBioscience
α -CD8 α	V500	1:500	53-6.7	BD Bioscience
α -IL7R α	Brilliant Violet TM 421	1:300	A7R34	BioLegend
α -CD45.1	Brilliant Violet TM 421	1:100	A20	BioLegend
α -IRF4	Alexa Fluor® 647	1:500	3E4	eBioscience
α -CD45.1	Pacific Blue TM	1:300	A20	BioLegend
α -CD25	PE-Cy TM 7	1:500	PC61	eBioscience
α -CD69	PE-Cy TM 7	1:500	H1.2F3	eBioscience

2.5.3 MHC-I Dextramere

Allel	Fluorochrom	Peptid	Antigen	Verdünnung	Hersteller
H-2K ^b	APC	SIINFEKL	Ovalbumin	1:20	Immindex
H-2D ^b	APC	KAVYNFATC	GP 33	1:20	Immindex
H-2D ^b	APC	FQPQNGQFI	NP 396	1:20	Immindex

2.5.4 Western Blot-Antikörper

Antikörper	Ursprung/Isotyp	Verdünnung	Herkunft
α - β Aktin	Maus, monoklonal	1:10.000	Sigma
α -BLIMP1 (3H2-E8)	Maus, monoklonal	1:200	Novus Biological
α -IRF4 (M-17)	Ziege, polyklonal	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology
α -Maus	Ziege, IgG (HRP)	1:1.000	Pierce Biotechnology
α -Kaninchen	Ziege, IgG (HRP)	1:1.000	Pierce Biotechnology

2.5.5 ChIP-Antikörper

Antikörper	Ursprung/Isotyp	Verwendung	Herkunft
IgG	Kaninchen-Serum	0,5 μ g	Sigma-Aldrich
α -RF4 (M-17) X	Ziege polyklonal	4 μ g	Santa Cruz Biotechnology

2.5.6 Zytokine

Name	Herkunft
IL-2 (Rekombinant human)	Eurocetus Proleukin Chiron
IL-12 (Rekombinant murin)	Peptotech GmbH
IL-21 (Rekombinant murin)	Peptotech GmbH

2.6 Größenstandards und Marker

DNA- Marker	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder	Fermentas Thermo Scientific
DNA-Ladepuffer	
6x Loading Dye	Fermentas Thermo Scientific
Protein-Marker	
PageRuler™ Plus	Fermentas Thermo Scientific

2.7 Primer

Bezeichnung	Sequenz, 5'-3'
<i>Bcl2</i>	for: gccctgtggatgactgagtacc rev: cca gga gaa atc aaa cag agg t
<i>Bcl6</i>	for: cct gtg aaa tct gtg gca ctc g rev: cgc agt tgg ctt ttg tga cg
<i>Eomesodermin</i>	for: ttt cgt gga agt ggt tct gg rev: cat ctt att gcc ctg cat gtt
<i>Gzmb</i>	for: act ctt gac gct ggg acc ta rev: agt ggggct tga ctt cat gt
<i>Gzmk</i>	for: ggc cat tta tgg cgt cca tcc ag rev: gtc gtg aga atg gga tga ac
<i>Id2</i>	for: acc aga gac ctg gac aga ac rev: aag ctc aga agg gaa ttc ag
<i>Id3</i>	for: gac tct ggg acc ctc tct c rev: acc caa gtt cag tcc ttc tc

Bezeichnung	Sequenz, 5'-3'
<i>Prdm1</i>	for: acatagtgaacgaccaccctg rev: caaagagggtattggcgtgtaag
<i>Prf</i>	for: gca gct gag aag acc tat cag gac rev: tct gag cgc ctt ttt gaa gtc
<i>T-box21</i>	for: caa caa ccc ctt tgc caa ag rev: tcc ccc aag cag ttg aca gt
<i>Hprt</i>	for:ctg gtg aaa agg acc tct cg rev: tga agt act cat tat agt caa ggg ca
<i>Il21 responsive element</i> (ChIP)	for: agc caa gac aga aac tgt gag t rev: cct ctc tgc tag agg tcg tg

2.8 Zelllinien

Primäre Zellen	Genotyp	Herkunft
EL4 (ATCC®TiB-39™)	murine Lymphomzelllinie aus C57BL/6N	Dr. Stefan Klein-Heßling, Universität Würzburg

2.9 Mikroorganismen

Bezeichnung	Herkunft
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD (<i>Lm</i> EGD)	Prof. Hans-Willi Mittrücker, UKE Hamburg
<i>Listeria monocytogenes</i> Ova (<i>Lm</i> Ova)	Prof. Hans-Willi Mittrücker, UKE Hamburg (Foulds et al., 2002)
Lymphozytäres Choriomeningitis Virus Armstrong 53b (LCMV Armstrong)	PD Dr. Markus J. Hofer, University of Sydney

2.10 Mausstämme

Für *L. monocytogenes*- und LCMV-Infektionen, Immunisierungen und Zelltransfers wurden in dieser Arbeit Wildtyp (WT) C57BL/6 Mäuse (Jackson Laboratory), *Irf4*^{-/-} Mäuse (Mittrücker et al., 1997), *Irf9*^{-/-} Mäuse (Suhara et al., 1996), kongene Ly5.1 Mäuse (Shen et al., 1985), OT-I Mäuse (Hogquist et al., 1994), OT-I/*Irf4*^{-/-} Mäuse (eigene Zucht) und OT-I /Ly5.1 Mäuse (eigene Zucht) verwendet.

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Listerien

3.1.1 Herstellen eines Listerienstocks

Um zu gewährleisten, dass bei jeder Infektion die gleiche Menge an Listerien injiziert wird, wurden Aliquots mit einheitlicher Bakterienlast hergestellt.

Listerien (Kapitel 2.9) wurden dazu in 200 ml LB Medium über Nacht (ÜN) bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach einmaligem Waschen in PBS (10 min bei 4000 g) wurden die Listerien in 20 ml PBS/10% Glycerin (v/v) resuspendiert und anschließend in Aliquots à 100 µl bei -80°C gelagert. Die Zugabe von Glycerin verhindert, dass die Bakterien beim Einfrierprozess durch Bildung von Eiskristallen geschädigt oder zerstört werden. Die Bestimmung der Keimbildenden Einheiten (*Colony Forming Units*, CFU) des hergestellten Bakterienstocks erfolgte zeitnah über das Ausplattieren einer seriellen Verdünnungsreihe, in PBS hergestellt, auf TSB (*Tryptic Soy Broth*) Agarplatten. Der Titer wurde wie folgt berechnet:

Titer (CFU/ml Kultur) = Koloniezahl ($> 10 < 100$) / Verdünnungsfaktor.

3.1.2 Infektion mit Listerien und LCMV

Der in Kapitel 3.1.1 hergestellte Bakterienstock wurde bei RT aufgetaut und mit sterilem PBS auf die finale Infektionsdosis verdünnt. Die Listerieninfektion der C57BL/6, Ly5.1, OT-I, *Irf4*^{-/-}, OT-I/*Irf4*^{-/-}, OT-I/Ly5.1⁺ Mäuse erfolgte intraperitoneal (i.p.) in einem Volumen von 200 µl PBS. Die Bestimmung der Bakterienlast (Kapitel 3.1.3) in Milz und Leber von C57BL/6 und *Irf4*^{-/-} Mäusen, erfolgte nach der Infektion mit 5×10^4 CFU des virulenten WT Listerienstamms *Lm* EGD. Für die Analyse der spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort wurden kongene (Ly5.1⁺) Mäuse nach dem adoptiven Zelltransfer (Kapitel 3.2.8) mit 1×10^5 CFU des rekombinanten Listerienstamms *Lm* Ova infiziert. Die Überprüfung der Infektionsdosis erfolgte durch eine serielle Verdünnungsreihe auf TSB Agarplatten.

Die LCMV Arm-Infektionen sowohl der C57BL/6, als auch der *Irf9*^{-/-} Mäuse erfolgte intraperitoneal (i.p.) mit 1000 PFU (*Plaque Forming Units*) und wurden

freundlicherweise von PD Dr. Markus Hofer durchgeführt.

3.1.3 Bestimmung der Bakterienlast

Um nach einer Listerieninfektion die Bakterienlast in Milz und Leber zu ermitteln, wird der Titer (CFU/ml Kultur) bestimmt.

Für die Organentnahme nach der Listerieninfektion wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Bis zur Homogenisierung wurden die Organe in Flüssigprobenbeutel in 1 ml PBS mit 0,05% Triton™ X-100 auf Eis gelagert. Triton™ X-100 gewährleistet die Zerstörung der Zellmembran, wodurch man beim späteren Ausstreichen auf der Agarplatte einzelne Listerienkolonien erhält. Die mechanische Homogenisierung der entnommenen Organe erfolgte in Flüssigprobenbeuteln. Anschließend wurden 3 Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) pro Organ in PBS/0,05% Triton™ X-100 hergestellt. Diese Verdünnungen und eine unverdünnte Probe wurden auf TSB Agarplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Auszählung der Kolonien und Titerberechnung wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Berücksichtigung fanden nur Platten, auf denen mind. 10 und max. 100 Kolonien wuchsen.

3.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden steril durchgeführt.

3.2.1 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Mauszellen in einem bestimmten Volumen PBS / 50% (v/v) Trypanblau resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypanblau färbt tote Zellen blau, wodurch sie von lebenden ungefärbten Zellen unterschieden werden können. Zur exakten Bestimmung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

Gesamtzellzahl (Zellen/ml) =

$(\text{Zellen} \cdot \text{Großquadrate} / x) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Volumen} \cdot \text{Kammerfaktor}$

3.2.2 Kultivierung von EL4-Zellen

Die Kultivierung der EL4-Zellen erfolgte in RPMI-Medium (10% FCS(v/v), 1% Penicillin G, 1% Streptomycin) in 75 cm² Zellkulturflaschen. Jeden dritten Tag wurde die Kultur 1:2 geteilt und mit frischem Medium versetzt.

Für den *ex vivo* Zytotoxizitätstest der CD8⁺ T-Zellen (Kapitel 3.2.11) wurden EL4-Zellen einen Tag zuvor geerntet, 1:2 geteilt und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.2.3 Anreicherung von CD8⁺ T-Zellen aus sekundär lymphatischen Organen

Die Isolation von murinen CD8⁺ T-Zellen aus sekundären Lymphorganen, erfolgte mit einer laboreigenen Methode, die auf dem Prinzip der negativen Selektion beruht. Dabei binden magnetischen *Beads* (biotinierte *microBeads*) an nicht erwünschte Zellen, die mit FITC-Antikörpern (Ak) markiert sind, um die gewollte Zellpopulation zu isolieren.

Nach der Tötung durch zervikale Dislokation wurden Lymphknoten und Milz entnommen, in BSS aufgenommen und getrennt voneinander durch ein Sieb (30 µm) gerieben. Die Milzzellen wurden mit Erythrozytenlysepuffer für 4 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit BSS wurden Milz- und Lymphknotenzellen in MACS-Puffer vereinigt, auf eine Konzentration von 4x10⁸/ml eingestellt und mit je 1:500 FITC-gekoppelten Ak (α-CD4, α-B220, α-CD11b, α-CD11c, α-CD49b, α-TER-119, α-MHC-II) für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer, erfolgte die Aufnahme in MACS-Puffer (10⁸/100µl Zellen) und eine 20-minütige Inkubation mit 1:30 von Biotin-gekoppelten α-FITC-Ak + Streptavidin bei 4°C. Daraufhin folgten zwei weitere Waschschriffe mit MACS-Puffer, anschließend erfolgte die Einstellung der Zellen auf eine Konzentration von 5x10⁷/ml in MACS-Puffer und eine 30-minütige Inkubation bei 4°C auf dem Rotator mit den biotinierten *microBeads* (1:30 verdünnt). Danach wurden die Zellen für weitere 30 min in einem Magnetständer bei RT platziert. Somit verblieben die mit den biotinierten *microBeads* markierten CD8⁻ Zellen am Rand des Reaktionsgefäßes und die nicht markierten CD8⁺ T-Zellen befanden sich in Suspension und konnten mit einer Pipette vorsichtig aus dem Reaktionsgefäß entnommen werden. Die Reinheit der isolierten

CD8⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft und betrug > 90%.

3.2.4 Aktivierung und Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen Zellen

Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen *in vitro* erfolgt zum einen über die Stimulation des TZR, mittels Ak die gegen den CD3-Komplex gerichtet sind, und zum anderen mit Ak die gegen das kostimulatorische Molekül CD28 gerichtet sind.

Für eine optimale Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen *in vitro*, wurde eine 24-well-Platte mit α -CD3, in einer Konzentration von 0,5 oder 2 μ g/ml gelöst in *Coating-Puffer*, ÜN bei 4°C in einer feuchten Kammer beschichtet. Kurz vor dem Einsetzen der CD8⁺ T-Zellen wurde die Platte dreimal mit BSS gespült und $0,8-1 \times 10^6$ der frisch isolierten CD8⁺ T-Zellen (Kapitel 3.2.6) in einem Gesamtvolumen von 1 ml RPMI-Vollmedium in die Platte eingesetzt und mit 1 μ g/ml α -CD28 und 50 U/ml IL-2 im Brutschrank inkubiert.

Für die Western Blot-Analysen (Kapitel 3.3) wurden die Zellen nach den indizierten Zeitpunkten geerntet. Für die mRNA- und ChIP-Analysen (Kapitel 3.4) wurden die Zellen nach 72 h geerntet und zweimal mit BSS gewaschen. Danach wurden sie gezählt und ohne Zugabe von Zytokinen in RPMI-1640 Medium aufgenommen (1×10^6 /ml Zellen) und für 24 h im Brutschrank ruhen gelassen. Nach dieser Ruhephase wurde das RPMI-1640 Medium entweder mit IL-2 (100 U/ml), IL-12 (10 ng/ml) oder IL-21 (100 ng/ml) supplementiert. Diese 3 verschiedenen Ansätze wurden für mRNA-Analysen nach 6 h und 24 h Inkubation im Brutschrank geerntet. Die Ansätze mit Zugabe von IL-21 wurden für ChIP-Analysen nach 1h Inkubation geerntet.

3.2.5 Adoptiver Zelltransfer

Für die Analyse der spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort wurden OT-I bzw. OT-I/*Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen in kongene (Ly5.1⁺) Mäuse transferiert.

Die isolierten CD8⁺ T-Zellen aus den Milzen der OT-I bzw. OT-I/*Irf4*^{-/-} Mäuse (Kapitel 3.2.3) wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS auf 4×10^4 /100 μ l PBS eingestellt und in die Schwanzvene (i.v.) der kongenen Mäuse injiziert. Im Anschluss an den adoptiven Zelltransfer erfolgte die Infektion mit *Lm* Ova (Kapitel 3.1.2).

3.2.6 Aufreinigung von Zellen aus Milz, Leber und Knochenmark

Für die Oberflächen- und intrazelluläre Färbung der CD8⁺ T-Zellen mittels fluorochrommarkierten Ak (Kapitel 3.2.7) wurden Milzen, Leber und Knochenmark (KM) aus *Lm* EGD, *Lm* Ova bzw. LCMV-infizierten C57Bl/6, *Irf4*^{-/-}, Ly5.1⁺ und *Irf9*^{-/-} Mäusen zu den indizierten Zeitpunkten entnommen, in BSS bzw. PBS aufgenommen und separat durch ein 30 bzw. 70 µm Sieb gerieben. Die Leber wurde vor der Entnahme mit 5 ml PBS durch die *V. portae hepatis* perfundiert.

Milzzellen wurden nach einem Waschschrift mit BSS für 4 min mit Erythrozytenlysepuffer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in BSS gewaschen und in PBS/ 1% FCS (v/v) aufgenommen und gezählt.

Mit Hilfe der Dichtezellzentrifugation können mononukleäre Lymphozyten aus Lebereinzelsuspensionen isoliert werden. Dafür wurde das Zellsediment der Leber nach dem Waschschrift mit BSS in 5 ml 40% Percoll® (v/v)/ RPMI-1640 Medium aufgenommen, vorsichtig auf 3 ml 70%igen Percoll® (v/v)/ RPMI-1640 Medium geschichtet und anschließend 20 min bei 530 g ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozyten, an der Grenzschicht zwischen den beiden Percollschichten, waren als weißer Ring sichtbar, der vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Es folgten 2 Waschschriffe in BSS mit anschließender Erythrozytenlyse, wie oben beschrieben. Nach einem Waschschrift mit BSS wurden die Zellen in PBS/ 1% FCS (v/v) aufgenommen und gezählt.

Die isolierten KM-Zellen aus dem Femur wurden in PBS aufgenommen, gewaschen und mit Erythrozytenlysepuffer behandelt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde die Zellsuspension durch ein 30 µm Sieb gerieben, erneut mit PBS gewaschen, in RPMI-Vollmedium aufgenommen und gezählt.

3.2.7 Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung mit Hilfe von Antikörpern

Für die Ak-Färbung der Zelloberfläche wurden zunächst je 1-2x10⁶ Milz-, Leber- und KM-Zellen von *Lm* EGD, *Lm* Ova bzw. LCMV-infizierten C57Bl/6, *Irf4*^{-/-}, Ly5.1⁺ und *Irf9*^{-/-} Mäusen in PBS/1% FCS (v/v) aufgenommen (Kapitel 3.1.2 & 3.2.6) und anschließend je nach Fragestellung mit Fluorochrom-konjugierten Ak gegen spezifische Oberflächenproteine in der angegebenen Verdünnung (Kapitel 2.5.2) 15 min

bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS/1% FCS (v/v) folgte die durchflusszytometrische Analyse (Kapitel 3.2.10.6) oder der Einsatz in die intrazelluläre Färbung.

Für die intrazelluläre IFN γ -, TNF α -, GranzymB- und IL-2-Färbung wurden Milz- und Leberzellen aus infizierten Mäusen entnommen und restimuliert (Kapitel 3.2.9). Nach der Oberflächenfärbung folgte ein Waschschrift mit PBS mit anschließender Fixierung für 20 min mit 1 ml 2% Formaldehyd (v/v)/ PBS bei RT im Dunkeln. Danach folgte ein Waschschrift mit PBS/ 1% FCS (v/v) und mit Saponinpuffer, um die Zellmembran kurzzeitig zu permeabilisieren. Anschließend erfolgte die Zugabe der fluorochrommarkierten Ak in der jeweiligen Verdünnung (Kapitel 2.5.2) und Inkubation für 20 min bei 4°C im Dunkeln. Nach weiteren Waschschriften mit Saponinpuffer und anschließend mit PBS/1% FCS (v/v) wurden die Zellen in PBS/1% FCS (v/v) aufgenommen im FACS analysiert (Kapitel 3.2.12).

Für die intrazelluläre IRF4-Färbung wurden 2x10⁶ Zellen der isolierten Milz- und Leberzellen einmal mit PBS gewaschen und direkt im Anschluss für 20 min im Dunkeln bei 4°C mit dem Foxp3 *Transcription Factor Staining Buffer Set* nach Herstellerprotokoll fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS/1%FCS (v/v) und nachfolgend mit Saponinpuffer wurden die Zellen für 20 min bei 4°C im Dunkeln mit 1:500 α -IRF4 Alexa Fluor® 647 inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift mit Saponinpuffer und PBS/1% FCS (v/v). Die IRF4-Expression wurde im FACS analysiert (Kapitel 3.2.12).

3.2.8 Dextramerfärbung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen

Fluorochrommarkierte MHC-I Dextramere binden an antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen, wodurch diese im FACS detektiert werden können.

An Tag 12 und 40 nach der *Lm* Ova-Infektion wurden je 2x10⁶ Milz-, Leber- und KM-Zellen von C57Bl6/N, *Irf4*^{-/-} oder *Irf9*^{-/-} Mäusen in 100 ml PBS/1% FCS (v/v) aufgenommen (Kapitel 3.2.6) und es folgte die Zugabe des gewünschten Dextramers (1:20 verdünnt) (Kapitel 2.5.3). Nach einer 10-minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT erfolgte die reguläre Oberflächenfärbung mittels Ak (Kapitel 3.2.7).

3.2.9 Peptidspezifische Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen

Um T-Zellen *ex vivo* zur Zytokinproduktion anzuregen, können sie u.a. antigenspezifisch aktiviert werden. Anschließend kann die Zytokinproduktion der CD8⁺ T-Zellen mittels intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch detektiert werden.

Zu dem indizierten Zeitpunkt nach adoptivem Zelltransfer und *Lm* Ova-Infektion wurden isolierte Milz- und Leberzellen (Kapitel 3.1.2, 3.2.5 und 3.2.6) mit SIINFEKL peptidspezifisch aktiviert. SIINFEKL befindet sich in Ovalbumin an der Aminosäureposition 257-264 (OVA₂₅₇₋₂₆₄). Die Buchstaben stellen die Aminosäuresequenz des Peptids dar. An Tag 8 bzw. Tag 30 nach der LCMV-Infektion wurden isolierte Milzzellen mit den Peptiden GP₃₃₋₄₁ bzw. NP₃₉₆₋₄₀₄ peptidspezifisch aktiviert. In LCMV ist GP₃₃₋₄₁ im Glykoprotein 33 an den Aminosäureresten 33-41 lokalisiert während NP₃₉₆₋₄₀₄ im Nukleoprotein an den Aminosäureresten 396-404 lokalisiert ist.

Für die Restimulation wurden 2-5x10⁶ Zellen in mit 10 nM SIINFEKL, 1 µM GP₃₃₋₄₁ oder 1 µM NP₃₉₆₋₄₀₄ versetztem RPMI-Vollmedium aufgenommen und insgesamt 5 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 5 µg/ml BrefeldinA. Als Negativkontrolle wurden Zellen ausschließlich mit BrefeldinA versetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS/1% FCS (v/v) gewaschen und die Zelloberfläche wurde mit Ak gegen CD8 und CD45.1 gefärbt, gefolgt von der intrazellulären Färbung mit α-IFNγ-, α-TNFα- und α-IL-2 (Kapitel 3.2.7).

3.2.10 CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester)-Färbung

CFSE ist ein fluoreszierender Vitalfarbstoff, der die Analyse der Proliferation von Zellen ermöglicht, da der CFSE-Anteil bei jeder Zellteilung halbiert wird. Durch intrazelluläre Esterasen werden Acetatgruppen vom CFSE abgespalten und in Fluoreszenz umgewandelt, die im FACS gemessen werden kann. Aufgrund der stabilen Bindungen wird aufgenommenes CFSE nicht auf angrenzende Zellen übertragen.

Für den Zytotoxizitätstest *ex vivo* (Kapitel 3.2.11) wurden durchflusszytometrisch sortierte OT-I bzw. OT-I/*Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um die Färbung durch im Medium befindliches FCS nicht zu beeinträchtigen. Anschließend wurden je 1x10⁷ Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und mit 2,5 µM bzw. 10 µM CFSE

versetzt und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 8 min wurde die Leuchtstofffärbung abgestoppt, zweimal mit RPMI-1640 Vollmedium gewaschen und eingesetzt.

3.2.11 Zytotoxizitätstest ex vivo

Hierbei werden ungefärbte CTLs in direktem Kontakt mit ihren CFSE-gefärbten *Targetzellen* (Kapitel 3.2.10) inkubiert und der Zelltod wird via FACS analysiert. Die spezifische Abtötung durch CTLs wird an den im FACS zu detektierenden CFSE-gefärbten *Targetzellen* gemessen.

CD8⁺ T-Zellen von OT-I bzw. OT-I/*Irf4*^{-/-} Mäusen wurden in kongene Mäuse transferiert (Kapitel 3.2.5), anschließend folgte die *Lm* Ova-Infektion (Kapitel 3.1.2). An Tag 6 p.i. wurden die Rezipienten durch zervikale Dislokation getötet, die Milzen entnommen und CD8⁺ T-Zellen daraus aufgereinigt und isoliert (Kapitel 3.2.3). Im Anschluss folgte die durchflusszytometrische Sortierung der OT-I bzw. OT-I/*Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen (Kapitel 3.2.12).

Gleichzeitig wurden EL4-Zellen geerntet, mit 2,5 µM (*Targetzellen*) bzw. 10 µM (Kontrollzellen) CFSE gefärbt (Kapitel 3.2.10). Die *Targetzellen* wurden anschließend für 90 min mit 10 nM SIINFEKL bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, zweimal mit RPMI-1640 Vollmedium gewaschen und je 5x10⁴ Zellen im Verhältnis 1:1 in eine Rundboden 96-*well*-Platte eingesetzt. Die sortierten OT-I bzw. OT-I/*Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen wurden in verschiedenen Effektor (CD8⁺) : *Target*-Verhältnissen zu den EL4-Zellen pipettiert (2:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0:1) für 3 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Es wurden jeweils Triplikate angefertigt. Anschließend wurden alle Ansätze geerntet und sofort im FACS analysiert (Kapitel 3.2.12). Die Berechnung des prozentualen Anteils der zytotoxischen Aktivität der CTLs erfolgte über folgende Formel:

$$(1 - \% \text{ der CFSE}^+ \text{ Targetzellen} / \% \text{ der CFSE}^+ \text{ Kontrollzellen}) * 100$$

3.2.12 Durchflusszytometrie und Zellsortierung

FACS-Geräte (*fluorescence activated cell sorter*) ermöglichen detaillierte Immunfluoreszenzanalysen von Zellsuspensionen bei gleichzeitiger Mehrfachfärbung mit Fluorochrom markierten Ak oder Vitalfarbstoffen (CFSE) und hohem Probendurchsatz. Größe (*Forward Scatter*, FSC) und Granularität (*Sideward Scatter*,

SSC) der Zellen beeinflussen die Vorwärts- und Seitwärtsstreuungen des Laserlichtes, die mit Photodetektoren gemessen werden (Schütt and Bröker, 2011).

Je nach Zellzahl wurden die Ak-markierten Zellen in 200-300 µl PBS/1% FCS (v/v) analysiert. Für die Messungen der Oberflächenfärbung und der intrazellulären Färbung wurde das BD FACSCalibur™ und das BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) verwendet. Für die Analyse wurde die BD CellQuest™ Pro *Software* verwendet. Die Datenauswertung erfolgte mittels des Programms FlowJo (Tree Star Inc.).

Die Zellsortierung ermöglicht es, gezielt eine Zellpopulation aus einem Zellgemisch zu isolieren und im weiteren Versuchsverlauf separat zu analysieren.

Für die Sortierung der OT-I und OT-I/*Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen an Tag 8 nach Zelltransfer und Infektion (Kapitel 3.1.2 & 3.2.5) am BD FACSAria™ III wurden 2x10⁷ Zellen/ml in PBS/1% FCS (v/v) aufgenommen. Die sortierten Zellen wurden in 15 ml Reaktionsgefäße aufgenommen (1 h mit 100% FCS bei 37°C vorinkubiert) und es folgte eine Reinheitsmessung und Zellzahlbestimmung. Anschließend folgten 2 Waschschrte mit PBS und die Zellpellets wurden für spätere qRT-PCR Analysen (Kapitel 3.4.1) bei -80°C eingefroren bzw. in den Zytotoxizitätstest *ex vivo* (Kapitel 3.2.11) eingesetzt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der BD FACSDiva™ *Software*.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinlysate

Vor der Herstellung der Proteinlysate wurden Zellpellets zweimal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach dem zweiten Waschschrte im Rücklauf resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 2000 g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet trocken gesaugt und in 80-100 µl des vorbereiteten Protease-Inhibitor-Cocktails resuspendiert und nachfolgend bei 13000 g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden vorsichtig abgenommen, aliquotiert und zeitnah bei -80°C eingefroren. Ein Aliquot wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Pierce verwendet.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Pierce

Die Proteinbestimmung nach Pierce erfolgt auf Grundlage der Biuret-Reaktion. Dabei bilden zweiwertige Kupfer- (Cu^{2+}) Ionen in alkalischer Lösung Komplexe mit Proteinen und werden zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure (BCA) reagieren. Durch die Bildung des BCA-Cu^+ -Komplex kommt es zu einem violetten Farbumschlag, der bei einer Wellenlänge von 550 nm angeregt wird und im ELISA Reader gemessen werden kann.

PBS wurde als Substratleerwert (*Blank*) verwendet. Als Standard für diesen Test wurde 1 mg BSA in 1 ml PBS gelöst und in einer seriellen Verdünnungsreihe, jeweils als Doppelbestimmung, aufgetragen. Die zu analysierende Probe wurde ebenfalls in einer mit PBS angefertigten seriellen Verdünnungsreihe aufgetragen. Das Endvolumen betrug dabei immer 20 $\mu\text{l/well}$. Anschließend wurde zu allen *wells* je 180 μl eines 50:1-Gemischs der BCA^{TM} Protein-Assay-Reagenz A und B pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C erfolgte die photometrische Messung der 96-*well*-Platte im ELISA Reader bei 550 nm.

3.3.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS- (*Sodium dodecylsulfate* = Natriumdodecylsulfat) Polyacrylamidgele ermöglichen die Proteinauftrennung der Größe nach. Vor dem Auftragen auf das Gel werden die Proteine mit Ladepuffer versetzt und kurzzeitig aufgeköcht. Das Erhitzen der Proben bewirkt die Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine und die linearisierten Proteine können gleichmäßig durch das Polyacrylamidgel wandern. Der Ladepuffer besteht aus β -Mercaptoethanol, das die Disulfidbrücken der Proteine löst, sowie aus SDS, das als anionisches Detergenz denaturierend auf Proteine wirkt. Die stark negative Ladung von SDS überdeckt die Proteineigenladung, wodurch sie einheitlich negativ geladen werden und beim Anlegen einer Spannung einheitlich zur Anode wandern.

Das SDS-Gel besteht aus 2 horizontal getrennten unterschiedlichen Schichten, einem Sammel- und einem Trenngel. Das Sammelgel besitzt relativ große Poren und einen anderen pH-Wert, wodurch die Proteine schnell durch das Gel laufen und an der Grenze zum Trenngel ankonzentriert werden. Aufgrund des höheren Polyacrylamidanteils im

Trenngel wird die Laufgeschwindigkeit verringert und die Auftrennung des Proteingemischs in einzelne Banden kann erfolgen.

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
H ₂ O	2,3 ml	1,4 ml
Rotiphorese® Gel 30	1,3 ml	0,33 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	
1 M Tris (pH 6,8)		0,25 ml
10% SDS	0,05 ml	0,02 ml
10% APS	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,003 ml	0,002 ml

Tab. 3.1 Zusammensetzung des Trenn- bzw. Sammelgels

Über das Trenngel (10%) (Tabelle 3.1) wurde nach der Polymerisierung das Sammelgel geschichtet, ein Kamm mit Probenaschen platziert und auspolymerisiert.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 4x Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgekocht und bis zur Gelbeladung auf Eis gelagert. Das vorbereitete SDS-Gel wurde in der Elektrophoresekammer platziert und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Es wurden 5 bzw. 20 µg Protein pro Tasche geladen und 5 µl des Markers Protein Ladder PlusTM liefen als Größenstandard mit. Es wurde eine Spannung von 90 V angelegt, die beim Übertritt der Proben in das Trenngel auf 120 V erhöht wurde.

3.3.4 Western Blot

Bei dieser Methode werden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf spezielle Membranen transferiert. Mit Hilfe spezifischer Ak können einzelne Proteine detektiert und quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurden die Proteine elektrophoretisch, mit Hilfe der Wet Blot-Technik, auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Proteine interagieren über ionische Wechselwirkungen mit der Membran und deren Anordnung bleibt erhalten. Beim Wet-Blotting werden Schwämme, Membran, Filterpapiere und Gel in eine entsprechende Blotapparatur geschichtet. Das angelegte elektrische Feld befindet sich senkrecht zum Gel und die Proteine können vom Gel auf die Membran transferiert werden.

Vor dem Aufbau wurden die Schwämme, Whatman Filterpapiere und Membran in Transferpuffer (4°C) getränkt und das Sammelgel wurde vom Trenngel entfernt. Für die Aktivierung der PVDF-Membran wurde diese zunächst für 5 s vollständig in Methanol getränkt, dann für 2 min in Aqua dest. gelegt und anschließend ebenfalls in Transferpuffer überführt. Die Blotapparatur wurde in der Blotkammer positioniert und diese wurde mit Transferpuffer (4°C) vollständig aufgefüllt und der Transfer erfolgte für ein Gel bei 200 mA für 1 h. Um unspezifische Ak-Bindungen abzusättigen, wurde die mit den Proteinen beladene Membran ÜN in Western Blot-Blockpuffer (ohne NaN₃) bei 4°C auf einem 3D-Rotator inkubiert.

3.3.5 Proteindetektion durch Antikörper

Nach dem Blocken der Membran erfolgt die Zugabe des Primär-Ak, der gegen das zu bestimmende Protein gerichtet ist. Der Sekundär-Ak, der mit einer *Horseradish Peroxidase* (HRP) konjugiert ist, richtet sich gegen Epitope des Primär-Ak. Mit Hilfe der ECL (*enhanced chemiluminescence*) wurden die markierten Proteine visualisiert. Die Chemilumineszenz-Reaktion wird von der HRP katalysiert, Luminol wird in Wasserstoffperoxid oxidiert, wodurch es zur Emission von bläulichem Licht kommt, welches bei einer Wellenlänge von 428 nm gemessen werden kann.

Der Primär-Ak wurde in der jeweiligen Verdünnung (Kapitel 2.6.4) in Western Blot-Blockpuffer + NaN₃ angesetzt, zugegeben und ÜN bei 4°C auf einem 3D-Rotator inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min in Western Blot-Waschpuffer bei RT auf dem Schüttler gewaschen. Danach wurde der entsprechende Sekundär-Ak (α - Maus oder α - Kaninchen, Kapitel 2.6.4) in Western Blot-Blockpuffer ohne NaN₃ angesetzt, zugegeben und für mind. 3 h bei 4°C auf dem 3D-Rotator inkubiert. Anschließend folgten wieder 3 Waschschrte mit Western Blot-Waschpuffer für jeweils 10 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Für schwer zu detektierende Proteine wurde das *Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* verwendet. Dabei wurden die ECL-Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und ca. 600- 800 µl dieses Gemischs wurden direkt auf der Membran für 1 min inkubiert. Bei gut zu detektierenden Proteinen wurde das hauseigene Luminol Reagenz bestehend aus Lösung A und B verwendet, 1000 µl Lösung A wurden mit 100 µl Lösung B und 0,3 µl H₂O₂ versetzt, für 2 min inkubiert und anschließend Hilfe

des Programms Gel CaptureTM am Micro Chemie-Gerät gemessen.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen *Real-Time PCR* (qRT-PCR) lassen sich Nukleinsäuren vervielfältigen und quantifizieren. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der klassischen Polymerasekettenreaktion (PCR). Das PCR-Produkt wird quantifiziert, indem die Fluoreszenz von interkalierenden Farbstoffen (z.B. *SYBR® Green*) während eines PCR-Zyklus gemessen wird. Der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich proportional zur Menge des PCR-Produkts in die DNA ein und somit korreliert die Zunahme der spezifischen DNA mit dem Fluoreszenzanstieg von Zyklus zu Zyklus.

Um eine spezifische mRNA zu analysieren, wurde Gesamt-RNA präpariert und mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expressionsmenge der spezifischen mRNA wurde, bezogen auf das *RNA-House Keeping Gene Hprt* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase), mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta$ Methode ermittelt.

Vor der RNA-Präparation wurden die Zellpellets zweimal mit PBS gewaschen. Bei kleinen Zellmengen ($< 0,5 \times 10^6$ Zellen) wurde das *RNeasy Micro Kit*, für größere Zellmengen ($> 1 \times 10^6$ Zellen) das *High Pure RNA Isolation Kit* verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte nach Herstellervorschrift. Es wurde 1 μ g RNA für die cDNA-Synthese mit dem *Maxima First strand cDNA synthesis Kit* mit Oligo dT-Primern eingesetzt. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren. Für die qRT-PCR wurde der *FAST SYBR® Green Master Mix* verwendet und die Genexpression wurde mit Hilfe des StepOnePlusTM gemessen. Die PCR Thermocycler-Bedingungen begannen mit einem Initiationsschritt bei 95°C für 10 min. Danach folgte ein PCR-Programm bestehend aus 2 Schritten mit 40 Zyklen, 95°C für 15 s und 60°C für 60 s. Die qRT-PCR wurden von der Medizinisch-technischen Assistentin (MTA) der AG Huber, Anna Guralnik, durchgeführt.

3.4.2 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Diese Methode dient dem Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen. Dabei wird eine spezifische Protein-DNA-Bindung zu einem bestimmten Zeitpunkt durch Formaldehydfixierung festgehalten. Für die Analyse der Protein-Chromatin-Komplexe werden die Zellen lysiert und durch Sonifikation wird DNA fragmentiert. Der nachzuweisende Protein-Chromatin-Komplex wird dann mit Hilfe von spezifischen Ak, gekoppelt an Sepharose-Beads, immunopräzipitiert und anschließend wird die bestimmte DNA-Sequenz mit der Methode der qRT-PCR nachgewiesen.

Chromatin-Isolierung

OT-I und OT-I/*Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen wurden für 72 h voraktiviert, ruhten danach für 24 h im Brutschrank, wurden anschließend für 1h mit IL-21 (100 ng/ml) inkubiert, nachfolgend geerntet (Kapitel 3.2.5) und einmal mit PBS gewaschen. Für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurden pro Ansatz je 2x10⁶ Zellen eingesetzt. Um die Protein-DNA-Bindung zu stabilisieren (*Crosslinking*), wurden die Zellen mit 1 ml PBS/1% FA (v/v) bei RT fixiert und nach 7 min wurde diese Reaktion mit einer finalen Konzentration von 0,125 M Glycin abgestoppt. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 2000 rpm, RT), anschließend in 800 µl Lyse-Puffer I *complete* (*complete*: mit Proteinaseinhibitoren) resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Für einen besseren Zellaufschluss wurde zwischendurch regelmäßig gevortext. Nach erneutem Pelletieren (5 min, 2000 rpm, RT) wurde das Zellkernpellet in 75 µl Lyse-Puffer II *complete* 4% SDS (v/v) resuspendiert, anschließend einmal kräftig gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zelllysate mit 225 µl Lyse-Puffer II *complete* auf 1% SDS verdünnt, optional für weitere 5 min bei RT inkubiert und danach für 3 min auf Eis inkubiert. Für die DNA-Fragmentierung wurden die Zelllysate im BioruptorTM UCD-200 bei 4°C in einem 30-fachen Zyklus für je 30 s abwechselnd sonifiziert.

Nach der Generierung des löslichen Chromatins (DNA-Fragmentierung) wurde der SDS-Gehalt der Proben mit Lyse-Puffer II *complete* (ohne SDS) auf 0,1% verdünnt und ÜN bei 4°C gelagert. Zur Überprüfung der Scheereffizienz wurde aus den jeweiligen Proben 50 µl des Überstandes entnommen und mit je 2,5 µl/Probe RNase A (5 µg/µl)

und 2,5 µl/Probe Proteinase K (20 mg/ml) für 3 h bei 55°C und anschließend ÜN bei 65°C im Thermocycler inkubiert. Von diesen Proben wurde am darauffolgenden Tag die DNA unter Zugabe von NaCl (Endkonzentration 0,2 M) und dem 0,7-fachen Gesamtvolumen an Isopropanol gefällt. Die Proben wurden invertiert und für 30 min bei 13000 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde zum Waschen 70%-iges Ethanol im gleichen Volumen wie die Probe zugegeben und für 5 min bei 13000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde bei 37°C getrocknet. Danach wurde es für 30 min in 25 µl Aqua dest. gelöst und anschließend wurden 10 µl der Proben auf ein 2%-iges Agarosegel geladen und bei 120 V für 1 h in TBE-Puffer aufgetrennt.

Vorreinigung der Protein-Chromatin-Komplexe (*Preclearing I und II*)

In den nächsten Schritten wurden die Protein-Chromatin-Komplexe durch Inkubation mit BSA-geblockten Sepharose *Beads* A/G in zwei Schritten „vorgereinigt“ (*Preclearing I und Preclearing II*), um vor der Immunpräzipitation (IP) unspezifische Bindungen der *Beads* und an die IP-Ak zu verhindern. Das benötigte Volumen der Sepharose *Beads* A/G für die *Preclearing*-Schritte berechnet sich nach folgender Formel: $20\text{ }\mu\text{l} * \text{Anzahl Proben} * \text{Anzahl IPs pro Probe} * 2$. Für die im weiteren Verlauf folgende IP wurde ebenfalls das Volumen der benötigten *Beads* nach folgender Formel berechnet: $30\text{ }\mu\text{l} * \text{Anzahl Proben} * \text{Anzahl IPs pro Probe}$.

Das jeweils errechnete Volumen der *Beads* wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß aufgenommen, die Menge am Reaktionsgefäß markiert und zweimal mit 5 ml Lyse-Puffer II 0,1% SDS *complete* gewaschen (5 min bei 3000 rpm bei 4°C). Danach wurde der Überstand mit der Pipette bis zur Markierung abgenommen und es wurden 5 ml Lyse-Puffer II 0,1% SDS *complete* + 100 µl BSA (Stock: 20 mg/ml) pro Probe zugegeben und ÜN bei 4°C auf dem 3D-Rotator inkubiert.

Die mit BSA geblockten *Beads* wurden am nächsten Tag einmal mit 5 ml Lyse-Puffer II 0,1% SDS *complete* gewaschen (3000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde bis zur Markierung mit der Pipette entfernt und verworfen. Ein Teil dieser geblockten *Beads* wurde für die später folgenden IPs entnommen und bei 4°C gelagert. Dabei wurden pro IP mind. 30 µl der geblockten *Beads* entnommen.

Für das *Preclearing I* des Chromatins, wurden die Proben mit den geblockten *Beads* für 2 h bei 4°C auf dem 3D-Rotator inkubiert. Dabei erfolgte die Zugabe der geblockten *Beads* nach folgender Formel: pro IP zu jeder Probe 20 µl der geblockten *Beads*. Für das *Preclearing II* des Chromatins wurden die restlichen geblockten *Beads* auf ein Volumen von 500 µl pro Probe mit Lyse-Puffer II 0,1% SDS *complete* eingestellt und mit 1 µg eines nicht spezifischen IgG-Ak (Sigma rabbit IgG) je IP pro Probe für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wurden die geblockten *Beads* dreimal mit 5 ml Lyse Puffer II 0,1% SDS *complete* gewaschen (3000 rpm, 5 min, 4°C) und in dem nachfolgend berechneten Volumen aufgenommen: pro Probe je IP 20 µl der Ak-gekoppelten *Beads*.

Die Chromatinproben des *Preclearing I* wurden nach der oben beschriebenen Inkubation auf dem 3D-Rotator zentrifugiert (8000 rpm, 5 min, 4°C). Für das *Preclearing II* wurde das sich nun im Überstand befindliche Chromatin in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl pro IP der Ak-gekoppelten *Beads* für 2 h bei 4°C auf dem 3D Rotator inkubiert. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation (IP).

Immunpräzipitation (IP)

Für die IP wurden die Proben des *Preclearing II* zentrifugiert (8000 rpm, 5 min, 4°C) und das im Überstand befindliche, gereinigte Chromatin wurde zunächst in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde das Chromatin gleichmäßig auf einzelne 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, für jede IP wurde ein Reaktionsgefäß verwendet. Zusätzlich wurden pro Probe 2 Aliquots an Gesamtchromatin, ca. 10% des Gesamtvolumens, als *Input* (Kontrolle) entnommen und bei 4°C aufbewahrt. Zu den einzelnen IP Proben wurden dann die entsprechenden Ak hinzugefügt. Als Kontroll-Ak wurde 0,4 µg Sigma rabbit IgG eingesetzt und als relevanter Ak wurde 4 µg α-IRF4 eingesetzt und ÜN bei 4°C auf dem 3D-Rotator inkubiert.

Elution der Immunpräzipitationsproben und Aufhebung des Crosslinkings

Am nächsten Tag wurden in jedes IP-Reaktionsgefäß 30 µl der bei 4°C gelagerten geblockten Sepharose *Beads* hinzugegeben und für 2 h bei 4°C auf dem 3D-Rotator inkubiert, um die Protein-Chromatin-Komplexe zu präzipitieren. Nach der Inkubation

wurden die Komplexe pelletiert (8000 rpm, 2 min, RT) und die Sepharose-Pellets wurden mit 1 ml nach folgendem Protokoll gewaschen (8000 rpm, 2 min, RT):

Puffer	Waschschritte
Waschpuffer I	2x
Waschpuffer II	2x
Waschpuffer III	4x
TE-Puffer (pH 8,0)	2x

Tab. 3.2 Waschprotokoll für die Sepharose-Beads

Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand verworfen. Um die Protein-Chromatin-Komplexe von den Ak-gekoppelten *Beads* zu eluieren, wurden 500 µl des frisch angesetzten Elutionspuffers zu den *Beads* hinzugefügt, kurz gevortext und für 30 min bei RT auf dem 3D-Rotator inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt (8000 rpm, 2 min, RT) und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Auflösung des *Crosslinkings*. Dafür wurden die am Vortag entnommenen und bei 4°C gelagerten *Input*-Proben mit Elutionspuffer auf 500 µl aufgefüllt. Zu den IP- und *Input*-Proben wurden 53 µl des folgenden Mastermix zugegeben und für 3 h bei 55°C und ÜN bei 65°C inkubiert:

Chemikalie	Volumen
5 M NaCl	20 µl
0,5 M EDTA (pH 8,0)	10 µl
1 M Tris (pH 7,2)	20 µl
Proteinase K (20 mg/ml)	1 µl
RNase A (5 mg/ml)	2 µl

Tab. 3.3 Zusammensetzung des Mastermixes für den Puffer zur Auflösung des *Crosslinkings*

Aufreinigung der DNA und qRT-PCR

Am nächsten Tag folgte die Aufreinigung der IP- und *Input*-DNA mit Hilfe des QIAquick *PCR purification Kit*TM nach Herstellerprotokoll. Die Menge der DNA wurde

am NanoDropTM bestimmt und die Proben wurden bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Für die qRT-PCR wurden zu 9,5 µl des in Tabelle 3.5 beschriebenen Mastermixes je 1 µl DNA zugefügt. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 2.7 aufgelistet.

Chemikalie	Volumen
1x SYBR Green Mix	5 µl
Primer for (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	0,5 µl
H ₂ O	3,5 µl

Tab. 3.4 Zusammensetzung des qRT-PCR Mastermixes

Das verwendete Protokoll bestand aus 40 Zyklen, ein Zyklus setzte sich aus 30 s bei 95°C Denaturierung, 30 s bei 60°C Anlagerung und 1 min bei 72°C Elongation zusammen. Vor dem Beginn der 40 Zyklen erfolgte die Auftrennung der DNA-Doppelstränge durch 15-minütiges Aufheizen bei 95°C. Die ChIP-Analysen wurden mit Unterstützung von Angelina Neumann (Masterstudentin der AG Huber) und Anna Guralnik durchgeführt.

3.5 Statistik

Alle Experimente wurden wenigstens zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Für die *in vivo* Versuche wurden Gruppen mit 3 bis 6 Tieren gebildet und die Werte von mindestens 2 Gruppen wurden miteinander verglichen. Der Vergleich von mehr als 2 Gruppen miteinander und der Test auf statistische Signifikanz erfolgte mit Hilfe von *one-way Analysis of variances (one-way ANOVA)*. Für den Vergleich von 2 Gruppen miteinander wurde der *Student's t* Test angewendet. Die Analyse der Bakterientiter erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Als signifikant galten P-Werte von kleiner als 5%, * bedeutet $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Die Graphen/Diagramme und Statistiken wurden mit dem Programm *GraphPad Prism* erstellt und die folgenden Abbildungen wurden mit *Adobe Illustrator* gestaltet.

4 Ergebnisse

Teil I

4.1 Der Einfluss von IRF4 auf die Differenzierung von Effektor CD8⁺ T-Zellen

4.1.1 IRF4 ist essentiell für die Kontrolle einer Listerieninfektion

CD8⁺ T-Zellen sind eine wichtige Komponente bei der antibakteriellen und antiviralen Immunantwort (Zhang and Bevan, 2011) und es ist bekannt, dass eine IRF4-Defizienz starke Auswirkungen auf die Th-Entwicklung hat. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass auch die zytotoxische Aktivität der CD8⁺ Effektor T-Zellen in *Irf4*^{-/-} Mäusen nach einer LCMV-Infektion beeinträchtigt ist (Mittrücker et al., 1997).

Von diesen Kenntnissen ausgehend, stellte sich die Frage in wie weit IRF4 die Differenzierung und Funktion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen beeinflusst. Um dies zu beantworten, wurde zunächst eine potente Effektorzellantwort mit Hilfe einer *L. monocytogenes* EGD (*Lm* EGD)-Infektion in C57Bl/6 Wildtyp (WT) und *Irf4*^{-/-} Mäusen induziert. Listerien sind obligat intrazelluläre Erreger, die vor allem in der Milz und Leber persistieren. Eine Listeriose induziert hauptsächlich eine starke CD8⁺ T-Zellantwort, wodurch mit Listerien infizierte Zellen erkannt und lysiert werden und die Infektion beseitigt wird (Pamer, 2004).

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion erfolgte die Entnahme der Milz und Leber um die bakteriellen Titer zu bestimmen (Abb. 4.1).

Beim Vergleich der beiden Genotypen zeigt sich 4 Tage (d 4) nach der *Lm* EGD-Infektion, dass *Irf4*^{-/-} Mäuse im Gegensatz zum WT, eine geringere Bakterienlast in Milz (A) und Leber (B) aufweisen. Dieser Befund lässt vermuten, dass die *Irf4*^{-/-} Mäuse in der frühen Phase der Listeriose, in der die Infektion zunächst durch das angeborene Immunsystem kontrolliert wird, die Fähigkeit besitzen, die Bakterien besser als der WT zu kontrollieren. An Tag 12, 25 und 40 (d 12, d 25 und d 40) nach der Infektion (p.i.) sind *Irf4*^{-/-} Mäuse jedoch nicht in der Lage, die Listerien vollständig zu eliminieren. Während im WT an Tag 12 keine Listerien nachweisbar sind, können

Irf4^{-/-} Mäuse die Listerien nur partiell kontrollieren. Auch an Tag 40 p.i. persistieren in einigen *Irf4*^{-/-} Mäusen noch immer Listerien in Milz und Leber.

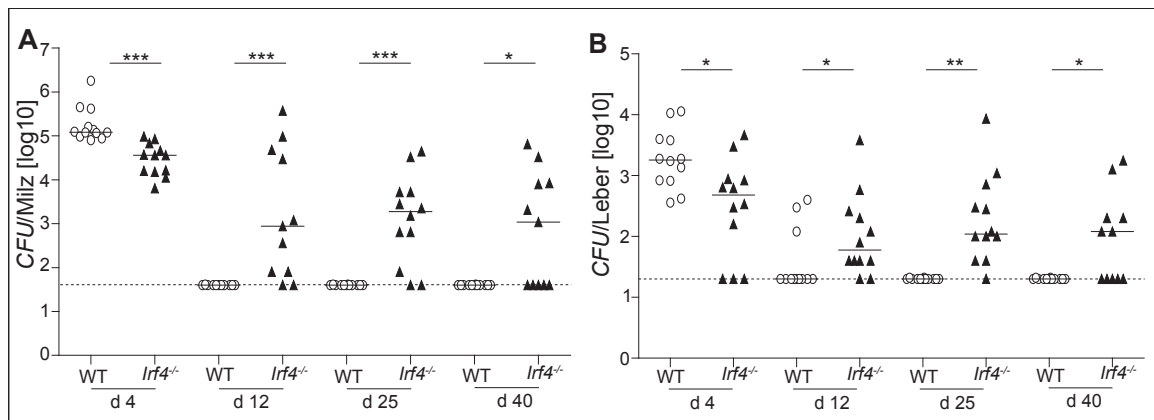


Abb. 4. 1 Titerbestimmung in Milz und Leber nach *Lm* EGD-Infektion. (A & B) WT (○)- und *Irf4*^{-/-} (▲) Mäuse wurden mit 5×10^4 CFU *Lm* EGD i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion erfolgte die Bestimmung der bakteriellen Titer in Milz (A) und Leber (B). Die gestrichelte Linie gibt das Detektionslimit an. Die Ergebnisse repräsentieren die individuellen Mäuse/Gruppe und es ist der Median von 2 miteinander kombinierten, voneinander unabhängigen Experimenten angegeben. Die P-Werte *, ** und *** stehen für $P < 0.05$, $P < 0.01$ und $P < 0.001$, die mit Hilfe des Mann-Whitney Test bestimmt wurden. Das Experiment wurde mind. dreimal wiederholt und bestätigt.

Im Verlauf einer Listerieninfektion werden naive CD8⁺ T-Zellen aktiviert, woraufhin sie sehr stark expandieren. Der vorangegangene Versuch hat gezeigt, dass einige *Irf4*^{-/-} Mäuse eine Listerieninfektion im Verlauf von 40 Tagen nicht vollständig beseitigen können. Die Eliminierung der Listerien erfolgt in Abhängigkeit von CD8⁺ T-Zellen, somit stellte sich die Frage, ob die unzureichende Beseitigung der Listerien in *Irf4*^{-/-} Mäusen auf Akkumulationsdefekte der CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen ist. Um diesen Sachverhalt zu klären, erfolgte die Quantifizierung der CD8⁺ T-Zellen während des Infektionsverlaufs. Dafür wurden Gesamtzellen aus Milzen der WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse an Tag 4, 12, 25 und 40 nach der *Lm* EGD-Infektion *ex vivo* mit anti-CD8 gefärbt, durchflusszytometrisch analysiert und statistisch ausgewertet (Abb. 4.2).

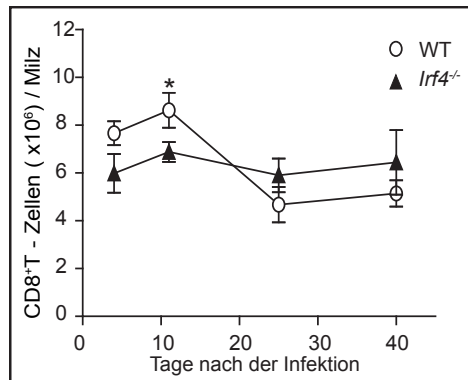


Abb. 4. 2 Zellzahlbestimmung nach *Lm* EGD-Infektion. WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse wurden mit 5×10^5 CFU *Lm* EGD i.p. infiziert. Zu den indizierten Zeitpunkten nach der Infektion wurden Milzzellen der WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse isoliert, mit anti-CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert und statistisch ausgewertet. Der Graph gibt die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen zu den indizierten Zeitpunkten an. Das Ergebnis repräsentiert den Mittelwert und die Standardabweichung von 6 Mäusen/Gruppe. Die P-Werte wurden via *Student's t* Test ermittelt. *, $P < 0,05$. Das Experiment wurde mind. dreimal wiederholt und bestätigt.

Die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen aus *Irf4*^{-/-} Mäusen ist über den gesamten Zeitraum der Infektion (Tag 4 bis Tag 40) hinweg annähernd konstant. Im Gegensatz dazu weisen WT CD8⁺ T-Zellen eine Expansionsphase mit Höhepunkt an Tag 12 p.i. auf, an die sich eine Kontraktionsphase anschließt.

Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass die erhöhte Bakterienlast und mangelhafte Eliminierung der Listerien in *Irf4*^{-/-} Mäusen (Abb. 4.1) wahrscheinlich auf eine defekte CD8⁺ T-Zellantwort zurückzuführen ist.

4.1.2 IRF4 wird für die Ausbildung eines Effektorphänotyps benötigt

Die vorherigen Versuche deuten daraufhin, dass *Irf4*^{-/-} Mäuse eine Listerieninfektion wahrscheinlich aufgrund einer defekten CD8⁺ T-Zellantwort nicht klären können. Daraus ergab sich die Frage, ob eine IRF4-Defizienz zu Aktivierungsdefekten in CD8⁺ T-Zellen führt. Um dies zu klären wurden die Expressionsmuster spezifischer Oberflächenmarker, die eine Unterscheidung in *SLECs* und *MPECs* zulassen, von CD8⁺ T-Zellen aus WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen untersucht. Zur Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort wurden WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse mit 5×10^4 CFU *Lm* EGD infiziert und an Tag 4, 12, 25 und 40 p.i. wurden Milzzellen aus WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen isoliert. Als Kontrolle dienten Zellen aus uninfizierten WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen. Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung mit Ak gegen CD8, CD62L,

CD44, KLRG1 sowie IL7R α und die durchflusszytometrische und statistische Analyse der positiv gefärbten CD8⁺ T-Zellen (Abb. 4.3).

CD8⁺ T-Zellen aus uninfizierten WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen (Tag 0) weisen keine Unterschiede in den prozentualen Anteilen der Expression von CD44 und CD62L bzw. KLRG1 und IL7R α auf (A & B obere Reihe). An Tag 12 p.i. sind jedoch sehr deutliche Unterschiede in den Expressionsmustern der CD8⁺ T-Zellen aus WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen sichtbar. WT CD8⁺ T-Zellen zeigen einen CD62L^{lo}CD44^{hi} und KLRG1^{hi}IL7R α ^{lo}-Phänotyp, der charakteristisch für *SLECs* ist. Im Gegensatz dazu weisen CD8⁺ T-Zellen aus *Irf4*^{-/-} Mäusen keine vermehrte CD62L^{lo}CD44^{hi}-Population auf und regulieren KLRG1 nicht hoch (A&B untere Reihe). Sie zeigen jedoch eine Hochregulation von CD44, die auch im weiteren Verlauf nach der Infektion bestehen bleibt (A & C), was darauf hindeutet, dass CD8⁺ T-Zellen aus *Irf4*^{-/-} Mäusen durch die *Lm* EGD-Infektion aktiviert wurden. Die graphische Darstellung der Expressionsanalyse unterstreicht, dass CD8⁺ T-Zellen von *Irf4*^{-/-} Mäusen auch im weiteren Infektionsverlauf einen eingeschränkten Phänotyp von aktivierten Effektorzellen (CD62L^{lo}CD44^{hi} und KLRG1^{hi}IL7R α ^{lo}) ausbilden (C).

Diese Befunde sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die gestörte Klärung der Listerien in *Irf4*^{-/-} Mäusen wahrscheinlich durch einen Generierungsdefekt von CD8⁺ Effektor T-Zellen bedingt ist.

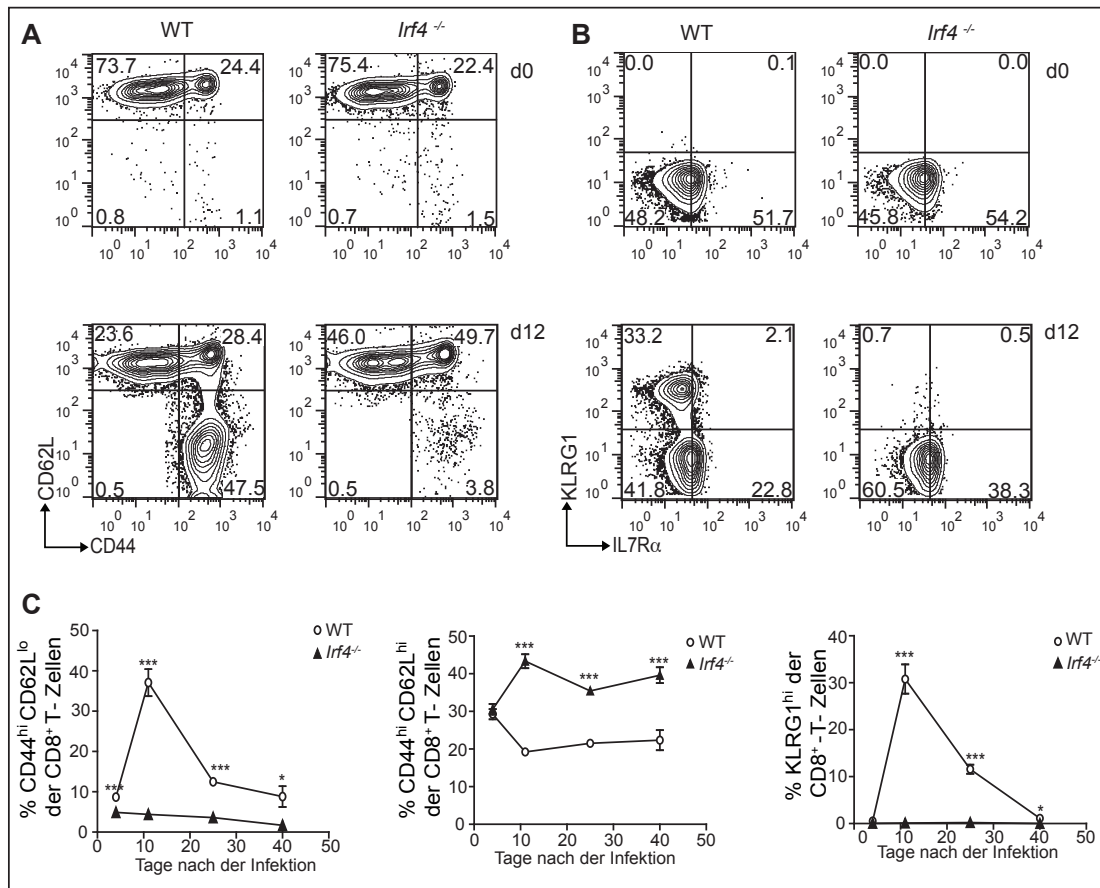


Abb. 4.3 Phänotypanalyse von WT und *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Messung der CD62L- und CD44-gefärbten CD8⁺ T-Zellen (A) bzw. KLRG1- und IL7Rα- gefärbten CD8⁺ T-Zellen (B) aus Gesamtzellen der Milz von WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen an Tag 0 (d0) und 12 (d12) p.i. (5×10^4 CFU) mittels FACS. Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation und es ist je ein repräsentatives Konturdiagramm pro Färbung und Gruppe gezeigt. (C) Statistische Auswertung des prozentualen Anteils der CD44^{hi}CD62L^{lo}-bzw. CD44^{hi}CD62L^{hi}-Zellen der CD8⁺ T-Zellpopulation und der KLRG1^{hi}-Zellen der CD8⁺ T-Zellpopulation zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. Angegeben ist der Mittelwert und der Standardfehler (n=6 Mäuse/Gruppe und Zeitpunkt). Die P-Werte *und *** stehen für $P < 0.05$ und $P < 0.001$ bestimmt mit Hilfe des *Student's t-Test*. Die Experimente wurden dreimal wiederholt und bestätigt.

4.1.3 Die mangelhafte Kontrolle der Listerieninfektion ist durch *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen bedingt.

Der TF IRF4 wird in Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimiert. Um besser beurteilen zu können, ob die unzureichende Klärung der Listerieninfektion in *Irf4*^{-/-} Mäusen, sowie der veränderte Phänotyp der *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen, durch die Dysregulation anderer Immunzellen bedingt ist oder auf einen intrinsischen Defekt der CD8⁺ T-Zellen hindeutet, wurden 5×10^6 kongene WT CD8⁺ T-Zellen (Ly5.1⁺) in *Irf4*^{-/-} Mäuse (Ly5.1⁻) i.v. transferiert. Am nächsten Tag erfolgte die *Lm* EGD-Infektion der *Irf4*^{-/-}-Rezipienten und Kontrolltiere, WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse,

ohne Zelltransfer. Die CFU-Bestimmung in Milz und Leber der infizierten Mäuse erfolgte 12 Tage p.i. (Abb 4.4).

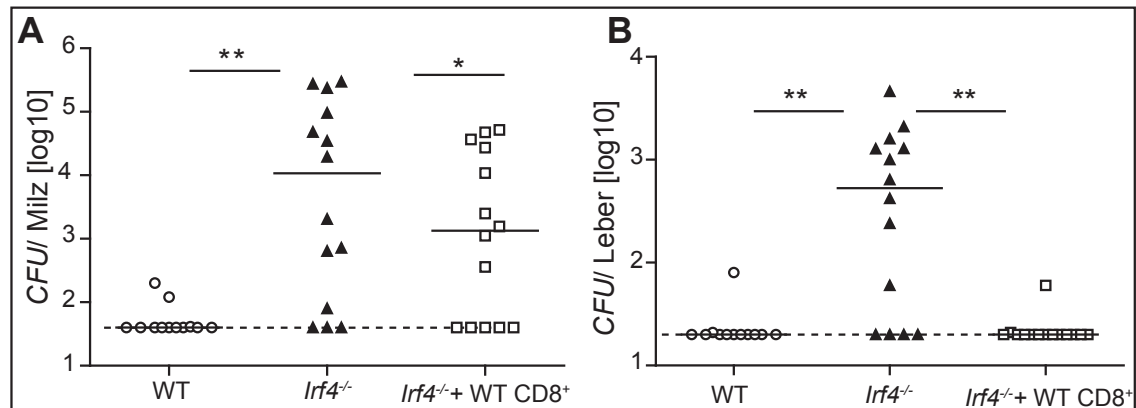


Abb. 4. 4 Titerbestimmung in Milz und Leber nach Rekonstitution. In *lrf4*^{-/-} Mäuse wurden 5x10⁶ WT CD8⁺ T-Zellen (Ly5.1⁺) i.v. transferiert (*lrf4*^{-/-} + WT CD8⁺) und anschließend erfolgte die Infektion mit 5x10⁴ CFU *Lm* EGD i.p.. WT und *lrf4*^{-/-} Mäuse wurden auf die gleiche Art und Weise infiziert. An Tag 12 p.i. erfolgte die Bestimmung der bakteriellen Titer (CFU) in Milz (A) und Leber (B). Die gestrichelte Linie gibt das Detektionslimit an. Die Ergebnisse repräsentieren die individuellen Mäuse/Gruppe. Es ist der Median von 2 miteinander kombinierten, voneinander unabhängigen Experimenten angegeben (n=14). P < 0.05 = * und P < 0.01=**, wurden mit Hilfe des Mann-Whitney Tests bestimmt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und bestätigt.

Die Rekonstitution von *lrf4*^{-/-} Mäusen mit WT CD8⁺ T-Zellen ermöglicht die effektivere Bekämpfung der Listerien. Die Bakterientiter in Milz und Leber dieser Mäuse sind 12 Tage p.i. im Vergleich zu *lrf4*^{-/-} Mäusen ohne Zelltransfer signifikant erniedrigt (A & B).

Darüber hinaus wurde der Phänotyp der transferierten WT (Ly5.1⁺) CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den endogenen CD8⁺ T-Zellen der *lrf4*^{-/-} Mäuse (Ly5.1⁻) via FACS analysiert. Dafür wurden an Tag 12 p.i. Milzzellen auf den kongenen Marker Ly5.1 und die Oberflächenmoleküle CD8, CD44, CD62L und KLRG1 gefärbt (Abb. 4.5).

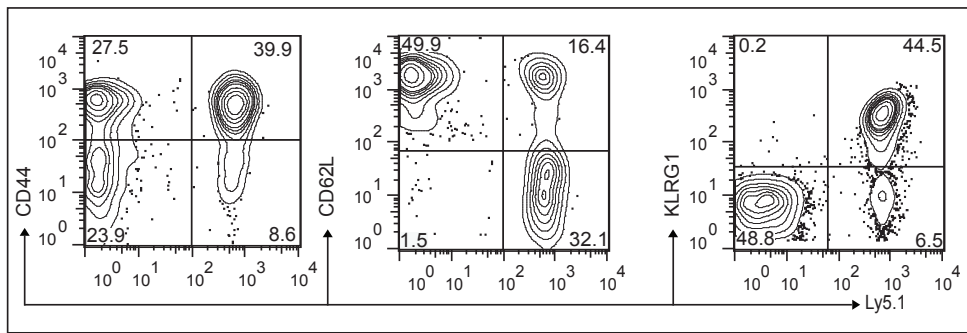


Abb. 4.5 Phänotypanalyse der CD8⁺ T-Zellen in rekonstituierten *Irf4*^{-/-} Mäusen. *Irf4*^{-/-} Mäuse (Ly5.1⁻) wurden mit 5x10⁶ WT (Ly5.1⁺) CD8⁺ T-Zellen i.v. transferiert und mit 5x10⁴ CFU *Lm* EGD i.p. infiziert. An Tag 12 p.i. wurden Milzzellen der rekonstituierten *Irf4*^{-/-} Mäuse präpariert mit anti-CD8, anti-Ly5.1, anti-CD44, anti-CD62L und anti-KLRG1 gefärbt und via FACS analysiert. Die Abbildung zeigt CD8⁺ T-Zellen, die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation an. Es ist jeweils ein repräsentatives Konturdiagramm gezeigt. Das Experiment wurde zweimal mit jeweils 7 Mäusen/Gruppe wiederholt und bestätigt.

Transferierte WT CD8⁺ T-Zellen regulieren im Gegensatz zu endogenen *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen KLRG1 hoch und CD62L herunter, was charakteristisch für CD8⁺ Effektor T-Zellen ist. CD44 wird sowohl von transferierten WT als auch von endogenen *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen hochreguliert.

Somit konnte gezeigt werden, dass WT CD8⁺ T-Zellen in einer IRF4-defizienten Umgebung Effektorzeleigenschaften generieren können. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die unzureichende Klärung der *Lm* EGD-Infektion auf einen intrinsischen Defekt der CD8⁺ T-Zellen in *Irf4*^{-/-} Mäusen zurückzuführen ist.

4.1.4 *Irf4*^{-/-} Mäuse generieren eine defekte antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantwort

Die vorangegangenen Ergebnisse suggerieren eine intrinsische Dysregulation der CD8⁺ T-Zellen aus *Irf4*^{-/-} Mäusen während einer Listerieninfektion. Um den direkten Einfluss von IRF4 auf die antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantwort zu analysieren, wurden WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse mit 1x10⁵ CFU eines rekombinanten Listerienstammes (*Lm* Ova), der eine verkürzte Form des Hühnerproteins Ovalbumin (Aminosäurenposition 134-387) exprimiert, infiziert.

Die Frequenz der *Lm* Ova-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber wurde ebenfalls untersucht. An Tag 12 nach der *Lm* EGD-Infektion zeigen *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen phänotypische Merkmale von Gedächtniszellen (CD44^{hi}CD62L^{hi}, KLRG1^{lo}). Da Gedächtniszellen zum großen Teil im KM residieren, wurde auch die Frequenz der

antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen aus dem KM durchflusszytometrisch analysiert und statistisch ausgewertet. Aus den genannten Organen wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung mit dem MHC-I Dextramer $H-2K^b/Ova_{257-264}$ und anti- $CD8$. Die Färbung mit dem fluoreszenzgekoppelten MHC-I Dextramer $H-2K^b/Ova_{257-264}$ ermöglicht die Analyse der *Lm* Ova-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen via FACS (Abb.4.6).

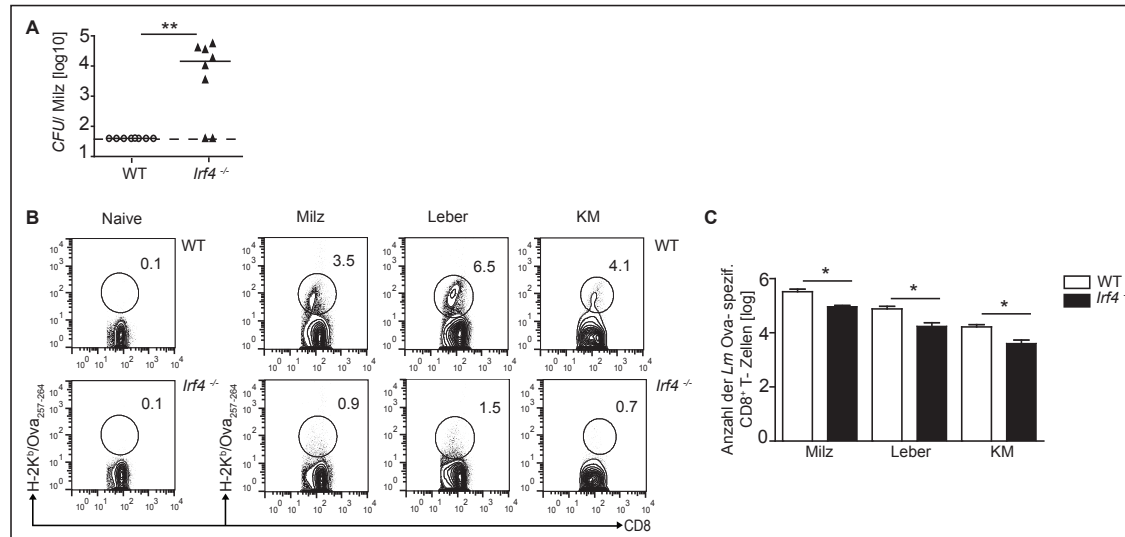


Abb. 4. 6 Titerbestimmung und Frequenzanalyse von peptidspezifischen WT und *Irf4*^{-/-} $CD8^+$ T-Zellen nach *Lm* Ova-Infektion. (A-C) WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse wurden mit 1×10^5 CFU *Lm* Ova i.p. infiziert und 12 Tage nach der Infektion (d12) analysiert. (A) CFU-Bestimmung in der Milz. Gezeigt sind die individuellen Mäuse/Gruppe und der Median von 2 miteinander kombinierten, unabhängigen Experimenten (n=8). Der P-Wert ** steht für $P < 0,01$ und wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Test bestimmt. Die gestrichelte Linie gibt das Detektionslimit an. (B&C) Gesamtzellen aus Milz, Leber und Knochenmark (KM) von naiven Mäusen (B) und an Tag 12 nach Infektion (C) wurden jeweils mit anti- $CD8$ und MHC-I Dextramer $H-2K^b/Ova_{257-264}$ Ak gefärbt und via FACS untersucht. Die Zahlenwerte entsprechen dem positiven Anteil der $H-2K^b/Ova_{257-264}$ Dextramer⁺ $CD8^+$ T-Zellen an der gesamten $CD8^+$ T- Zellpopulation. Es ist ein repräsentativer Contour Plot pro Färbung und Organ gezeigt (n=4). (D) Anzahl der $H-2K^b/Ova_{257-264}$ Dextramer⁺ $CD8^+$ T-Zellen in Milz, Leber und KM von WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen. Es ist der Mittelwert und Standardfehler angeben, n=4. Die P-Werte wurden mit Hilfe des Student's t Test ermittelt, * entspricht $P < 0,05$. (A-D) Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Die Bestimmung der Bakterienlast in der Milz an Tag 12 p.i., zeigt, dass *Irf4*^{-/-} Mäuse eine signifikant erhöhte CFU an *Lm* Ova aufweisen, während der WT die Listerien geklärt hat (A). In naiven WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse sind nur Hintergrundlevel an antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen nachweisbar. An Tag 12 p.i. sind die Level an *Lm* Ova-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in Milz, Leber und KM aus *Irf4*^{-/-} Mäusen mind. um das Vierfache geringer als im WT (B). Die statistische Auswertung bestätigt, dass *Irf4*^{-/-} Mäuse im Vergleich zum WT eine signifikant geringere Anzahl an antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen in den genannten Organen generieren (C).

Somit weisen *Irf4*^{-/-} Mäuse Defekte in der Produktion von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen auf und sind nicht in der Lage, eine *Lm* Ova-Infektion zu klären. Diese Beobachtung ist konsistent mit den generierten Daten nach der *Lm* EGD-Infektion.

Um den Einfluss von IRF4 auf die Generierung von antigenspezifischen Effektorzellen zu untersuchen, folgte im nächsten Schritt die phänotypische Analyse der *Lm* Ova-spezifischen CD8⁺ T-Zellen 12 Tage p.i.. Gesamtzellen aus Milz und Leber der infizierten WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse wurden isoliert, mit H-2K^b/Ova₂₅₇₋₂₆₄, anti-CD8, anti-CD62L, anti-CD44, anti-KLRG1 und anti-IL7Rα gefärbt und via FACS analysiert (Abb. 4.7).

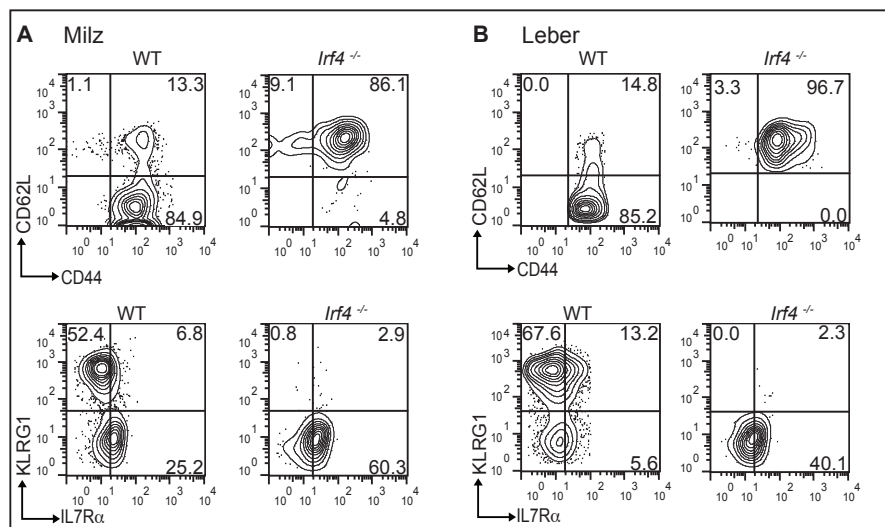


Abb. 4. 7 Phänotypanalyse der peptidspezifischen WT und *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nach *Lm* Ova-Infektion. (A & B) An Tag 12 p.i. mit 1x10⁵ CFU *Lm* Ova wurden Gesamtzellen aus Milz (A) und Leber (B) der WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen isoliert und *ex vivo* mit dem MHC-I Dextramer H-2K^b/Ova₂₅₇₋₂₆₄ und anti-CD8, anti-CD62L, anti-CD44 bzw. anti-KLRG1 und anti-IL7Rα gefärbt und via FACS analysiert. Die Abbildung zeigt die Expression von CD62L/CD44 und KLRG1/IL7Rα der H-2K^b/Ova₂₅₇₋₂₆₄-Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen. Es sind jeweils repräsentative Konturdiagramme dargestellt. Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation. Das Experiment wurde dreimal mit 4 Mäusen/Gruppe mit konsistenten Ergebnissen durchgeführt.

Ein großer Anteil der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen aus Milz (A) und Leber (B) der WT Mäuse weisen den für Effektorzellen typischen Phänotyp (CD62L^{lo}CD44^{hi} und KLRG1^{hi}IL7Rα^{lo}) auf. Im Gegensatz dazu weisen *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen weiterhin eine hohe CD62L-Expression und eine kaum detektierbare KLRG1-Expression auf. Die *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen weisen auch hier eine CD44^{hi}-Population auf, was eine Aktivierung dieser Zellen indiziert.

Die Defekte in der Ausbildung eines Effektorphänotyps bei CD8⁺ T-Zellen aus *Irf4*^{-/-} Mäusen führten zu der Frage ob *Irf4*^{-/-} Mäuse als Antwort auf eine Listerieninfektion funktionelle CD8⁺ Effektor T-Zellen generieren können, die u.a.

durch die erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN γ und TNF α charakterisiert sind. Daher wurden 12 Tage p.i. Milzzellen aus WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen isoliert und mit SIINFEKL (Ova₂₅₇₋₂₆₄) und BrefeldinA bzw. als Kontrolle mit BrefeldinA allein stimuliert (n.s.). Anschließend wurden die CD8⁺ T-Zellen auf die Expression von IFN γ , TNF α und IL-2 durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.8).

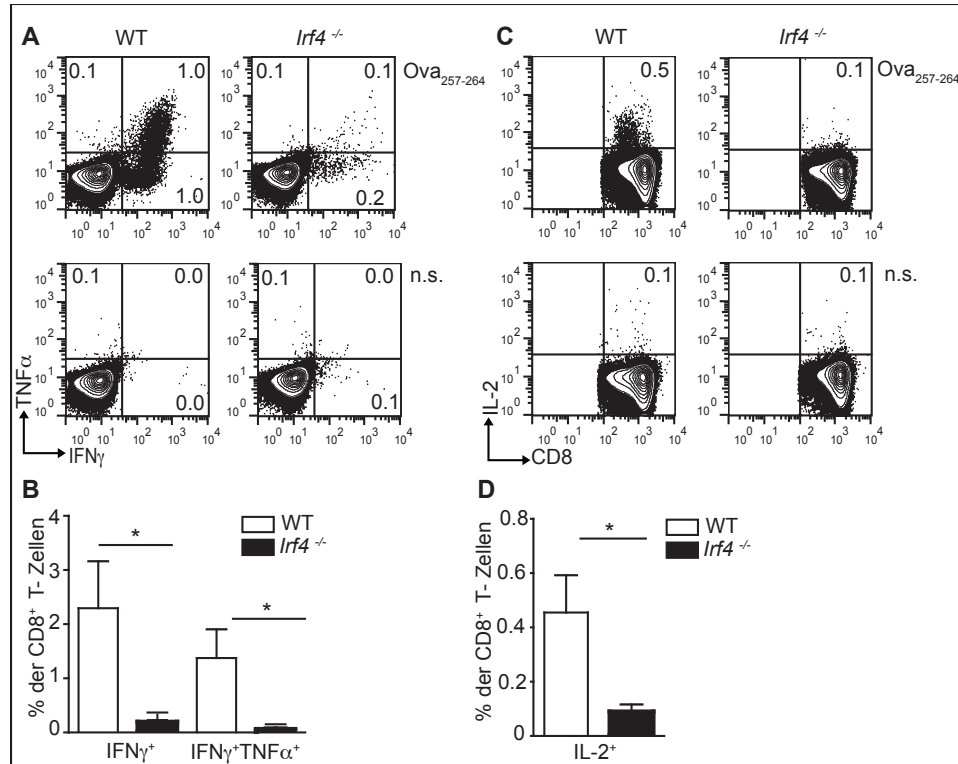


Abb. 4. 8 Peptidspezifische Zytokinproduktion der WT und *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nach *Lm* Ova-Infektion. (A&B) An Tag 12 p.i. wurden Milzzellen aus WT und *Irf4*^{-/-} Mäusen isoliert und für 5 h mit Ova₂₅₇₋₂₆₄ und BrefeldinA bzw. ohne Ova₂₅₇₋₂₆₄ (n.s.) restimuliert. Die Zelloberfläche wurde mit anti-CD8 gefärbt, anschließend erfolgte die intrazelluläre Zytokinfärbung mit anti-IFN γ , anti-TNF α und anti-IL-2. Die Abbildung zeigt die Produktion von IFN γ und TNF α (A) bzw von IL-2 (B) der CD8⁺ T- Zellen. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil der eingegrenzten Zellpopulation an. Die Graphen geben die IFN γ ⁺, IFN γ ⁺ und TNF α ⁺ bzw. die IL-2⁺ der ausschließlich mit Ova₂₅₇₋₂₆₄ und BrefeldinA stimulierten CD8⁺ T-Zellen an und stellen den prozentualen Mittelwert und den Standardfehler dar (n=4). Die P-Werte wurden mittels *Student's t Test* ermittelt, * = P < 0,05. Die Experimente wurden dreimal mit 4 Mäusen/Gruppe mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Die Sekretion von IFN γ und TNF α (A & B) in *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen ist im Vergleich zum WT signifikant reduziert und eine IL-2-Produktion (C & D) ist nicht detektierbar. Somit führt die Abwesenheit von IRF4 zu einer stark eingeschränkten CD8⁺ Effektorfunktion während einer Listerieninfektion.

4.1.5 Die IRF4-Expression wird in CD8⁺ T-Zellen durch TZR-Aktivierung induziert und korreliert mit der Ausbildung des Effektorphänotyps

In CD4⁺ T-Zellen wird IRF4 durch die Aktivierung des TZRs und verschiedene Zytokine induziert (Gupta et al., 1999; Huber et al., 2008). Die Kinetik der IRF4-Expression in CD8⁺ T-Zellen während einer Infektion ist noch nicht beschrieben. Daher wurde diese in den folgenden Versuchen *in vitro* mittels Western Blot und *in vivo* via FACS analysiert (Abb. 4.9). Für die Western Blot-Analysen wurden CD8⁺ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten von WT Mäusen isoliert und *in vitro* mit plattengebundenen anti-CD3 (0,5 bzw. 2 µg/ml) für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert (A & B). Die Analyse der IRF4-Expression *in vivo* erfolgte mit Hilfe eines Transfermodells. Dafür wurden 4x10⁴ WT und *Irf4*^{-/-} CD8⁺ OT-I Zellen (beide Ly5.1⁻), die einen transgenen TZR exprimieren, der ausschließlich das Peptid SIINFEKL aus dem Protein Ovalbumin erkennt, in kongene WT Mäuse (Ly5.1⁺) i.v. transferiert. Einen Tag nach dem adoptiven Zelltransfer erfolgte die *Lm* Ova-Infektion (1x10⁵ CFU) der Rezipienten. An den Tagen 2, 4, 6, 8 und 14 p.i. wurden Gesamtzellen der Milz und Leber isoliert und die transferierten CD8⁺ und Ly5.1⁻ Zellen wurden auf die intrazelluläre IRF4-Expression durchflusszytometrisch analysiert (C).

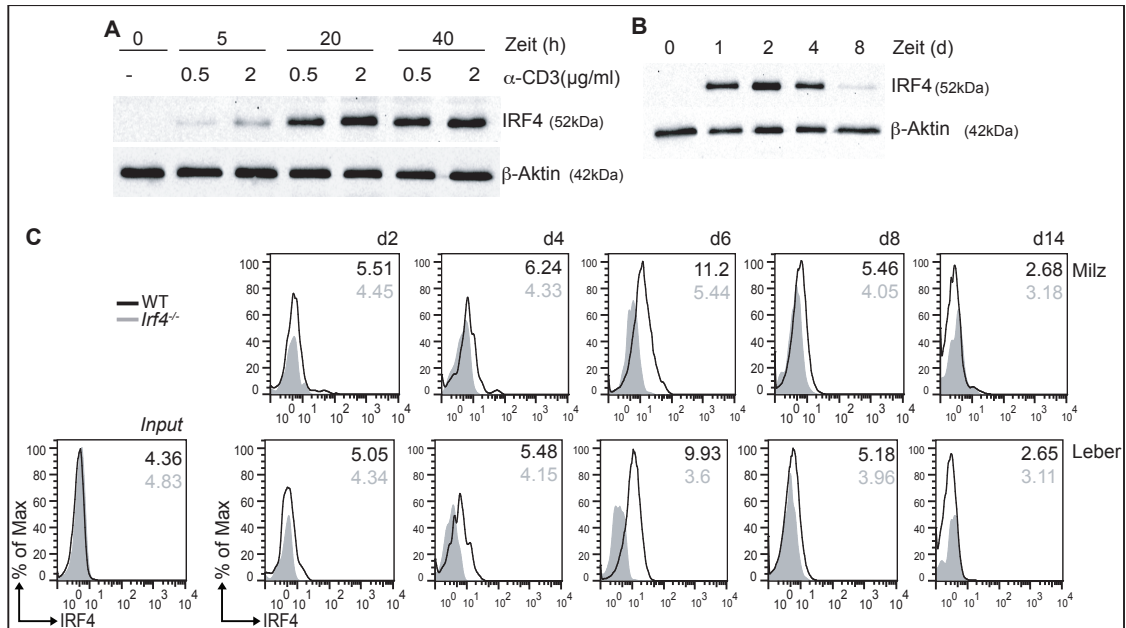


Abb. 4. 9 IRF4-Kinetik in CD8⁺ T-Zellen *in vitro* und *in vivo*. (A & B) Polyklonale WT CD8⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten isoliert und aufgereinigt und *in vitro* mit anti-CD3 stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden von den unterschiedlichen Ansätzen Zelllysate hergestellt und die IRF4- und β-Aktin-Expression mittels Western Blot bestimmt. Die Expression von β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (A) Stimuliert mit 0,5 μg/ml bzw. 2 μg/ml anti-CD3 (B). (C) CD8⁺ T-Zellen aus OT-I und *Irif4*^{-/-} OT-I Mäusen wurden isoliert und in WT Ly5.1⁺ Mäuse i.v. transfertiert (jeweils 4x10⁴ Zellen). Anschließend erfolgte die Infektion mit 1x10⁵ CFU *Lm Ova*. Zu den indizierten Zeitpunkten wurden Gesamtzellen aus Milz und Leber der infizierten Mäuse isoliert und die Zelloberfläche wurde mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Färbung mit anti-IRF4. Die Analyse erfolgte via FACS. *Input* bezeichnet den Zustand der CD8⁺ T-Zellen vor dem Transfer. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von IRF4 der CD8⁺ Ly5.1⁺ OT-I Zellen an. Das Experiment wurde dreimal mit konsistenten Ergebnissen wiederholt, *in vivo* mit 3 Mäusen/Gruppe und Zeitpunkt.

In unstimulierten (0 h) CD8⁺ T-Zellen ist IRF4 nicht detektierbar. Aufgrund der TZR-Stimulation durch anti-CD3, wird die IRF4-Expression *in vitro* sehr schnell nach ca. 5 h induziert und erfolgt in den ersten 20 h nach TZR-Stimulation in Abhängigkeit von anti-CD3 (A). Von Tag 1 (d 1) bis Tag 4 (d 4) befinden sich CD8⁺ T-Zellen *in vitro* in einem aktivierten Zustand und erhöhte IRF4-Expressionslevel sind detektierbar. Danach gehen die Zellen vermutlich in einen Ruhezustand mit verminderter IRF4-Expression über (B).

Die Expression von IRF4 *in vivo* ist ab dem vierten Tag p.i. in Milz und Leber der Rezipienten detektierbar. An Tag 6 p.i. wird IRF4 jeweils am stärksten exprimiert und sinkt im weiteren Verlauf (d 8 und d 14) ungefähr auf das Level von naiven Zellen (C). IRF4 wird 6 Tage p.i. am stärksten exprimiert. Zum Zeitpunkt der akuten Listeriose an Tag 12 p.i. weisen CD8⁺ T-Zellen aus *Irif4*^{-/-} Mäusen Defekte in der Generierung eines Effektorphänotyps auf. Die folgende Analyse und statistische Auswertung sollte Aufschluss darüber geben, ob ein Zusammenhang zwischen der IRF4-Expression und

der Generierung von aktivierten CD8⁺ T-Zellen besteht. Der Transfer der CD8⁺ OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen und die *Lm* Ova-Infektion erfolgten wie oben beschrieben. Zu ausgewählten Zeitpunkten p.i. wurden Milzzellen der Rezipienten präpariert und CD8⁺ Ly5.1⁻ Zellen wurden auf die Expression von CD62L/CD44 und KLRG1/IL7Rα durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.10).

Die Expression eines Effektorphänotyps (CD62L^{lo}CD44^{hi} und KLRG1^{hi}IL7Rα^{lo}) (A) ab dem sechsten Tag p.i. korreliert bei transferierten OT-I Zellen mit der maximalen IRF4-Expression (B).

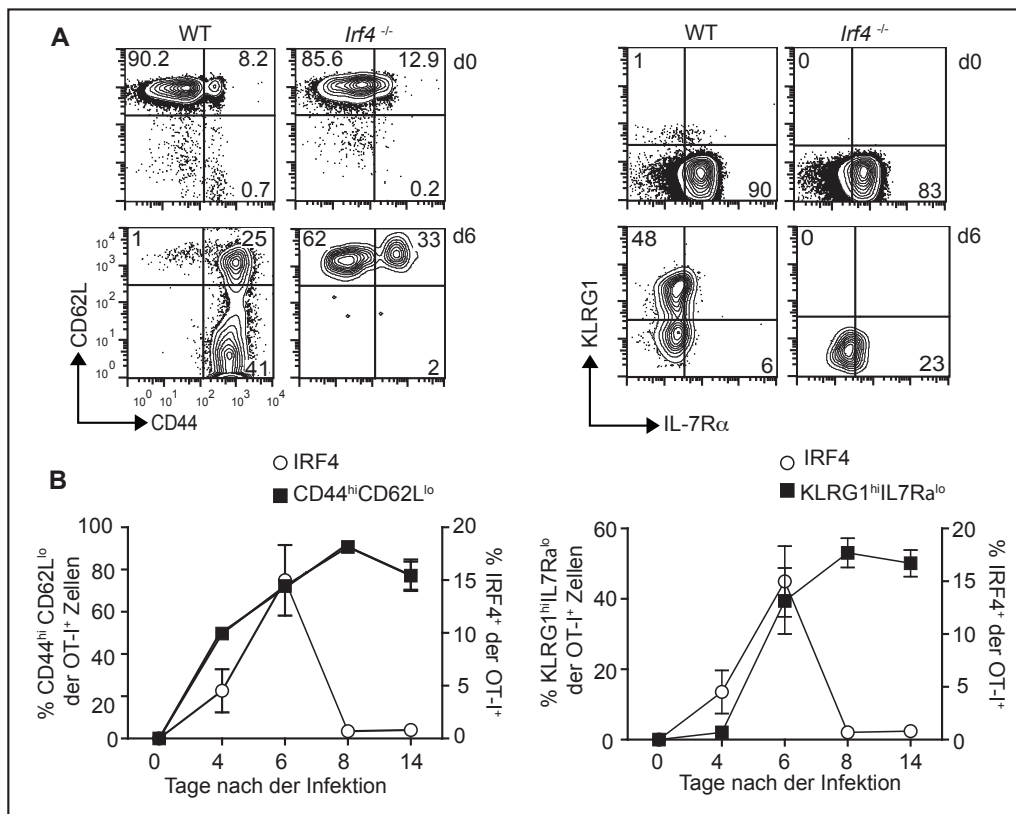


Abb. 4.10 IRF4-Expression in CD8⁺ T-Zellen in Korrelation mit dem Phänotyp nach *Lm* Ova-Infektion. (A & B) 4×10^4 CD8⁺ T-Zellen aus OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Mäusen (Ly5.1 negativ) wurden aufgereinigt, isoliert und in Ly5.1⁺ Mäuse i.v. transferiert, die anschließend mit *Lm* Ova infiziert wurden. (A) Vor dem Transfer (aufgereinigte CD8⁺ T-Zellen d 0) bzw. an Tag 6 nach der Infektion wurden Gesamtzellen aus der Milz der infizierten Mäuse isoliert und mit anti-CD8, -Ly5.1, -CD62L, -CD44 und -KLRG1, -IL7Rα gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Contour Plot und die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil der jeweils eingegrenzten Zellpopulation. (B) Gezeigt ist die Korrelation der IRF4-Expression und der Erwerb des Effektorphänotyps in den transferierten OT-I Zellen zu den indizierten Zeitpunkten nach der Listerieninfektion. Angegeben ist der Mittelwert und Standardfehler von 4 Mäusen. Die Experimente wurden dreimal mit 4 Mäusen/Gruppe zu jedem Zeitpunkt mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

4.1.6 *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen weisen während der Listerieninfektion Defekte in der Akkumulationsfähigkeit auf

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die mangelhafte Klärung einer Listerieninfektion in *Irf4*^{-/-} Mäusen durch eine intrinsische Dysregulation der CD8⁺ T-Zellen bei gleichzeitig reduzierter Anzahl an antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen bedingt ist. Um die Bedeutung der intrinsischen Funktion von IRF4 für CD8⁺ T-Zellen bei der Expansion zu bestätigen, wurden Transferversuche durchgeführt. Dabei wurden zunächst 4×10^4 CD8⁺ OT-I bzw. *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen (Ly5.1⁻) in Ly5.1⁺ Mäuse i.v. transferiert. Anschließend wurden die Rezipienten mit 1×10^5 CFU *Lm* Ova i.p. infiziert. An Tag 2, 4, 6, 8 und 40 wurden Gesamtzellen aus Milz und Leber

der Rezipienten isoliert, und die Zelloberfläche wurde anschließend mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt, via FACS untersucht und statistisch ausgewertet (Abb. 4.11).

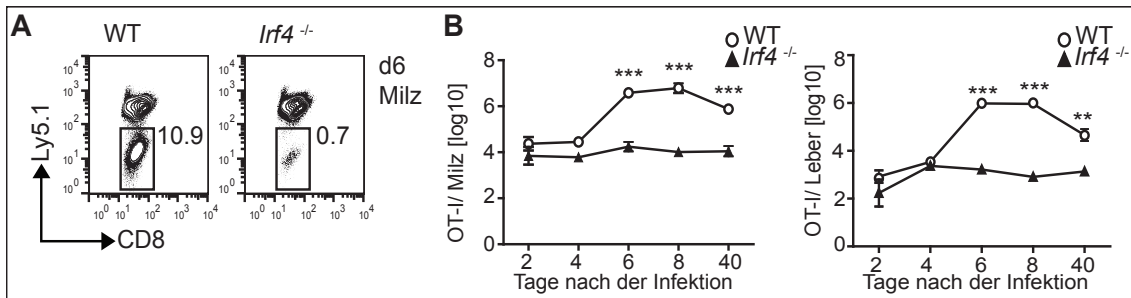


Abb. 4.11 Zellzahlbestimmung der transferierten WT und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen nach *Lm* Ova-Infektion. (A & B) OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I CD8⁺ T-Zellen (Ly5.1⁺) wurden zunächst aus den jeweiligen Mäusen isoliert und in kongene Ly5.1⁺ Mäuse i.v. transferiert (jeweils 4x10⁴ Zellen). Im Anschluss erfolgte die Infektion der Rezipienten mit 1x10⁵ CFU *Lm* Ova i.p.. Zu den indizierten Zeitpunkten p.i. wurden Milz- und Leberzellen der Rezipientenmäuse präpariert, mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentatives Konturdiagramm der Frequenz der transferierten OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen aus der Milz an Tag 6 (d6) p.i.. Angegeben ist der prozentuale Anteil der eingegrenzten CD8⁺ Ly5.1⁺ Zellpopulation. (B) Bestimmung der Zellzahl der transferierten OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen aus Milz und Leber. Angegeben ist der Mittelwert und der Standardfehler von jeweils 4 Mäusen/Gruppe. Die P-Werte wurde mit Hilfe des *Student's t* Test ermittelt. Dabei entspricht *** P < 0,001. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

An Tag 6 p.i. ist die Frequenz der transferierten *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen im Vergleich zum WT um das Fünfzehnfache reduziert (A). Des Weiteren zeigt die Zellzahlbestimmung der transferierten CD8⁺ T-Zellen, dass die Frequenzunterschiede zwischen OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen in Milz und Leber der Rezipienten fast über den gesamten zeitlichen Infektionsverlauf vorhanden sind. Die Anzahl der *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen ist in beiden Organen im Vergleich zu den OT-I Zellen signifikant verringert (B).

4.1.7 Die Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen ist IRF4-abhängig

Während der akuten *Lm* Ova-Infektion weisen *Irf4*^{-/-} Mäuse fulminante Defekte in der Produktion von Effektorzytokinen auf (Abb. 4.8). Mit Hilfe der folgenden Experimente wurde der intrinsische Einfluss von IRF4 auf die Effektorfunktionen von CD8⁺ T-Zellen untersucht. Dafür wurden wie bereits beschrieben, 4x10⁴ OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I CD8⁺ Zellen in kongene WT Mäuse transferiert und mit 1x10⁵ CFU *Lm* Ova infiziert.

An Tag 6 p.i. wurden Milzzellen der infizierten Rezipienten präpariert und anschließend mit SIINFEKL und BrefeldinA für 5 h stimuliert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der transferierten OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen auf die

Produktion von $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und IL-2. Als Kontrolle wurden naive OT-I und $\text{Irf4}^{-/-}$ OT-I Zellen (d 0) stimuliert (Abb. 4.12).

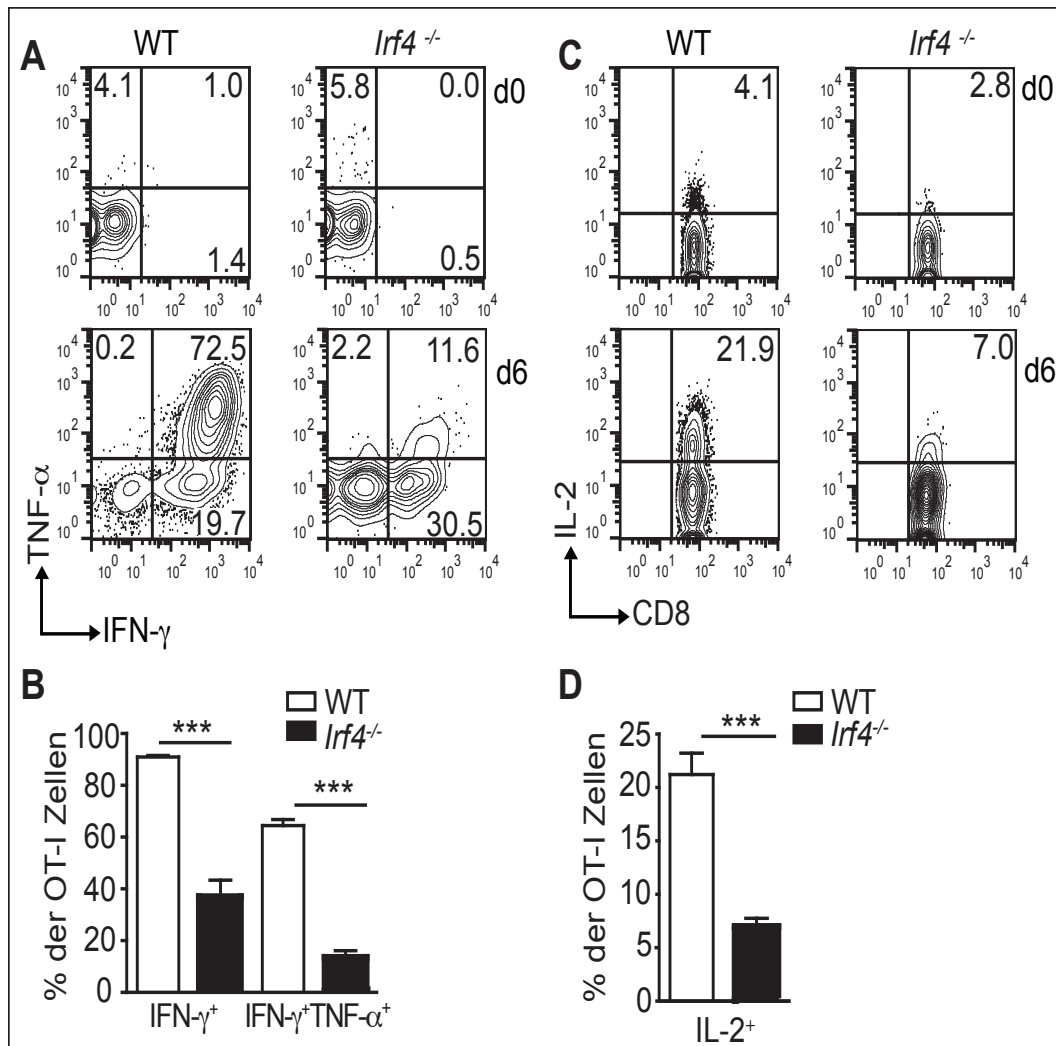


Abb. 4. 12 Zytokinproduktion von OT-I und $\text{Irf4}^{-/-}$ OT-I Zellen an Tag 6 nach *Lm Ova*-Infektion. (A & B) Jeweils 4×10^4 aufgereinigte OT-I und $\text{Irf4}^{-/-}$ OT-I Zellen (Ly5.1⁺) wurden in Ly5.1⁺ Mäuse i.v. transferiert, die anschließend mit 1×10^5 CFU *Lm Ova* i.p. infiziert wurden. Naive OT-I und $\text{Irf4}^{-/-}$ OT-I Zellen und Milzzellen wurden 6 Tage p.i. präpariert und analysiert. Die Zellen wurden für 5 h mit SIINFEKL und BrefeldinA restimuliert. Anschließend wurde die Zelloberfläche mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt, gefolgt von der intrazellulären Zytokinfärbung mit anti-IFN γ , anti-TNF α und anti-IL-2, die via FACS analysiert wurde. Gezeigt sind repräsentative Konturdiagramme der IFN γ -, TNF α - und IL-2-Expression von CD8⁺Ly5.1⁺ Zellen. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation an. Die Graphen geben den Mittelwert und Standardfehler der Prozente der positiven Zellen von 4 Mäusen/Gruppe an Tag 6 nach der Listerieninfektion an. Die P-Werte wurden mittels *Student's t* Test errechnet, *** P < 0,001. Die Experimente wurden mind. zweimal wiederholt und bestätigt.

Naive OT-I und $\text{Irf4}^{-/-}$ OT-I Zellen (d 0) produzieren nach Stimulation nur Hintergrundlevel an Zytokinen (A & C obere Reihe). An Tag 6 (d 6) p.i. nach Stimulation mit SIINFEKL und BrefeldinA sezernieren $\text{Irf4}^{-/-}$ OT-I Zellen kaum TNF α und nur geringe Mengen IFN γ (A untere Reihe & B) und produzieren im

Vergleich zu OT-I Zellen 2 Drittel weniger IL-2 (C untere Reihe & D). Diese Daten weisen daraufhin, dass IRF4 intrinsisch an der Ausbildung der Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen beteiligt ist.

CD8⁺ Effektor T-Zellen sind u.a. dadurch charakterisiert, dass sie die Eliminierung von infizierten Zellen durch die Sezernierung von zytotoxischen Molekülen, wie Granzymen und Perforin, induzieren. *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen weisen während der akuten Listerieninfektion eine verminderte Zytokinproduktion auf, daher sollte in den folgenden Experimenten der direkte Einfluss von IRF4 auf die zytotoxische Funktion der CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Dafür wurden 4x10⁴ CD8⁺ OT-I und OT-I *Irf4*^{-/-} Zellen (jeweils Ly5.1⁺) wie bereits beschrieben in kongene WT Mäuse (Ly5.1⁺) transferiert, die anschließend mit 1x10⁵ CFU *Lm* Ova infiziert wurden (Abb. 4.13).

An Tag 6 p.i. wurden Milzzellen der infizierten Ly5.1⁺ Mäuse präpariert, und die transferierten OT-I und OT-I *Irf4*^{-/-} Zellen wurden *ex vivo* auf die GranzymB (GranB)-Produktion via FACS analysiert. Als Kontrolle wurde die GranB-Produktion in naïven WT und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen analysiert (d 0) (A). Weiterhin wurden die transferierten OT-I und OT-I *Irf4*^{-/-} Zellen zusätzlich *ex vivo* aus Milzzellen der infizierten Ly5.1⁺ Mäuse *gesortet* und mittels qRT-PCR wurde anschließend die mRNA-Expression von GranzymB (*Gzmb*), GranzymK (*Gzmk*) und Perforin1 (*Prfl*) bestimmt (B). OT-I *Irf4*^{-/-} Zellen produzieren auf Proteinebene im Vergleich zu OT-I Zellen um den Faktor 2 weniger GranB und auch die mRNA-Expressionslevel der zytotoxischen Effektorproteine *Gzmb*, *Gzmk* und *Prfl* sind in *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen sehr stark reduziert, im Vergleich zum WT (A & B). Die qRT-PCR wurde von Anna Guralnik durchgeführt.

Mit Hilfe eines antigenspezifischen Zytotoxizitätstests *ex vivo* sollte verifiziert werden, dass die spezifische Zelllyse von CD8⁺ Effektor T-Zellen während einer akuten Listerieninfektion IRF4-abhängig erfolgt. An Tag 6 p.i. wurden OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen aus Milzzellen der Rezipienten sortiert. Gleichzeitig wurden EL4-Zellen geerntet und mit 2,5 µM (*Targetzellen*) bzw. 10 µM (Kontrollzellen) CFSE gefärbt. Anschließend wurden die EL4-Zellen im Verhältnis 1:1 (je 5x10⁴ Zellen) in eine 96-*well*-Platte eingesetzt und die sortierten OT-I bzw. *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen wurden in verschiedenen Effektor (CD8⁺) : *Target* Verhältnissen zu den EL4-Zellen pipettiert (2:1;

1:1, 0,5:1; 0,25:1; 0:1). Nach einer Inkubation von 3 h wurden alle Ansätze geerntet und sofort im FACS analysiert (C).

In Übereinstimmung mit den reduzierten Protein- und mRNA-Expressionslevel der zytotoxischen Effektorproteine, zeigen *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen 6 Tage p.i. eine sehr stark reduzierte zytotoxische Aktivität im Vergleich zu OT-I Zellen. Auch bei einer Effektor zu Target Ratio von 1:1 und 2:1 ist die spezifische Zelllyse der *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen nur marginal vorhanden.

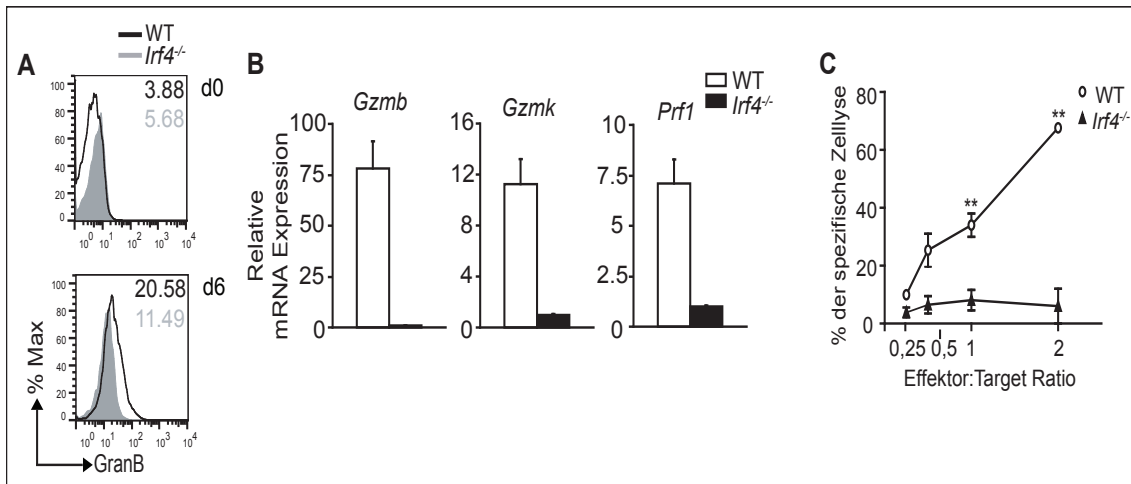


Abb. 4.13 Zytotoxische Aktivität der transferierten OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen. CD8⁺ T-Zellen aus OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Mäusen (Ly5.1⁺) wurden aufgereinigt und in Ly5.1⁺ Mäuse transferiert, jeweils 4x10⁴ Zellen. Anschließend erfolgte die *Lm* Ova-Infektion mit 1x10⁵ CFU. (A) An Tag 6 nach der Infektion wurden Milzen der infizierten Mäuse präpariert und die Zelloberfläche wurde mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt, gefolgt von einer intrazellulären Färbung mit anti-GranB. Das Histogramm zeigt die GranB-Expression von CD8⁺ Ly5.1⁺ Zellen. Die Zahlenwerte entsprechen der mittleren Fluoreszenzintensität der jeweiligen Zellpopulation. (B) Aus Milzzellen der infizierten Ly5.1⁺ Mäuse wurden CD8⁺ Zellen negativ aufgereinigt und mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt. Es folgte die Zellsortierung der CD8⁺ Ly5.1⁺ Zellen. Diese Zellen wurden anschließend auf die *GranB*, *GranK* und *Perf1* mRNA-Expression via qRT-PCR analysiert. Die Werte wurden mit denen von *Hprt* verglichen. Der niedrigere Wert wurde bei der Auswertung jeweils auf 1 gesetzt. Die Balken entsprechen der Standardabweichung von pipettierten Duplikaten der gleichen Probe. (C) Die zytotoxische Aktivität der OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen wurde *ex vivo* nach 3 h peptidspezifischer Aktivierung in einem CFSE-Assay gemessen. In diesem Assay waren EL4-Zellen entweder mit 2,5 μ M (Targetzellen) oder mit 10 μ M (Kontrollzellen) CFSE markiert. Die Targetzellen waren mit SIINFEKL beladen. Die OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen wurden im angegebenen Verhältnis („Effektor“) zu den EL4-Zellen („Target“) pipettiert. Die peptidspezifische Lyse ist dargestellt und der Mittelwert aus Triplikaten ist angezeigt; die Balken zeigen die Standardabweichung an. Die Berechnung der zytotoxischen Aktivität erfolgte nach der Formel: (1 % CFSE⁺ Targetzellen/ % CFSE⁺ Kontrollzellen) * 100. Die Ergebnisse wurden in 2 voneinander unabhängigen Versuchen bestätigt. Die P-Werte wurden mittels Student's t Test berechnet, **, P < 0,01.

Somit zeigte sich, dass die Effektorfunktionen der CD8⁺ T-Zellen sehr stark IRF4-abhängig reguliert werden, weshalb *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen mit Listerien infizierte Zellen wahrscheinlich nicht eliminieren können.

4.1.8 *IRF4 beeinflusst die transkriptionelle Regulation der CD8⁺ T-Zellen*

Die terminale Differenzierung von CD8⁺ Effektor und Gedächtnis T-Zellen wird durch ein transkriptionelles Programm kontrolliert, das auf der abgestimmten Expression von spezifischen TF-Paaren basiert (Kapitel 1.7). Die vorangegangenen Ergebnisse haben gezeigt, dass *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen Defekte in der Effektorzelldifferenzierung aufweisen. Um nun den Einfluss von IRF4 auf die Expression von TF, die in den Differenzierungsprozess involviert sind, zu untersuchen, wurden die mRNA-Expressionslevel von BLIMP1 und BCL6, TBX21 und EOMES, ID2 und ID3 in OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen analysiert. Dafür wurden jeweils 4x10⁴ CD8⁺ OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen (jeweils Ly5.1⁺) in kongene WT Mäuse (Ly5.1⁺) i.v. transferiert, anschließend erfolgte die *Lm* Ova-Infektion i.p. (1x10⁵ CFU). An Tag 6 nach Zelltransfer und Infektion wurden die OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen aus den Milzzellen der Rezipientenmäuse nach CD8⁺ Ly5.1⁻ sortiert und die mRNA-Expressionslevel der erwähnten TF wurden mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt (Abb. 4.14). Die qRT-PCR wurde von Anna Guralnik durchgeführt.

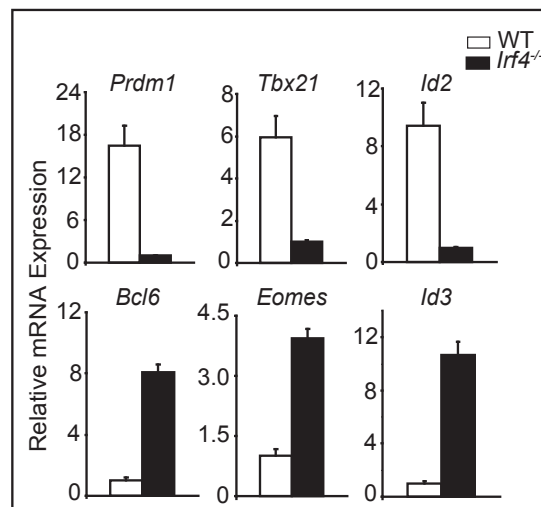


Abb. 4. 14 mRNA-Expressionslevel von TF, die die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen regulieren. Jeweils 4x10⁴ aufgereinigte CD8⁺ T-Zellen aus OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Mäusen (jeweils Ly5.1⁺) wurden in Ly5.1⁺ Mäuse transferiert und anschließend erfolgte die *Lm* Ova-Infektion i.p. mit 1x10⁵ CFU. An Tag 6 nach Zelltransfer und Infektion wurden Milzzellen der Rezipienten *ex vivo* mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt und OT-I sowie *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen wurden *gesortet*. Anschließend wurde die RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert. Die mRNA-Expressionslevel von *Prdm1*, *Tbx21*, *Id2* und *Bcl6*, *Eomes*, *Id3* wurden via qRT-PCR bestimmt. Die Werte wurden mit denen von *Hprt* normalisiert und der geringste Wert wurde bei der Auswertung auf 1 gesetzt. Die Balken entsprechen der Standardabweichung von Duplikaten der gleichen PCR-Probe. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und bestätigt.

Die Expression der mit der Effektorzellendifferenzierung assoziierten TF TBX21 (*Tbx21*), BLIMP1 (*Prdm1*) und ID2 (*Id2*) ist im Vergleich zu OT-I Zellen in *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen stark reduziert. Im Gegensatz dazu werden die mit der Gedächtniszellendifferenzierung assoziierten TF BCL6 (*Bcl6*), EOMES (*Eomes*) und ID3 (*Id3*) verstärkt in *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen exprimiert. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die Generierung von CD8⁺ Effektor T-Zellen IRF4-abhängig erfolgt und lassen vermuten, dass IRF4 die transkriptionelle Regulation zugunsten der Effektorzellendifferenzierung fördert.

4.1.9 IRF4 kontrolliert die IL-21-abhängige *Prdm1*-Expression in CD8⁺ T-Zellen

Der TF BLIMP1 ist bei viralen Infektionen von großer Bedeutung für die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu funktionellen CTLs (Kallies et al., 2009). Da der Phänotyp von *Prdm1*^{-/-} CD8⁺ Effektor T-Zellen Ähnlichkeiten zum Phänotyp der *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen aufweist (Rutishauser et al., 2009) und BLIMP1 in *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen während einer *Lm* Ova-Infektion nicht exprimiert wird, stellte sich die Frage, ob IRF4 die Expression von BLIMP1 in aktivierten CD8⁺ T-Zellen direkt reguliert. Um diese Frage zu klären, wurden aufgereinigte WT und *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen zunächst für 3 Tage voraktiviert. Nach einer 24-stündigen Ruhephase ohne Zytokinzugabe, erfolgte die Zugabe von IL-2, IL-12 oder IL-21 für eine, 6 bzw. 24 h, da diese Zytokine die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen positiv beeinflussen (Cui and Kaech, 2010; Cui et al., 2011). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zytokinzugabe (Abb. 4.15).

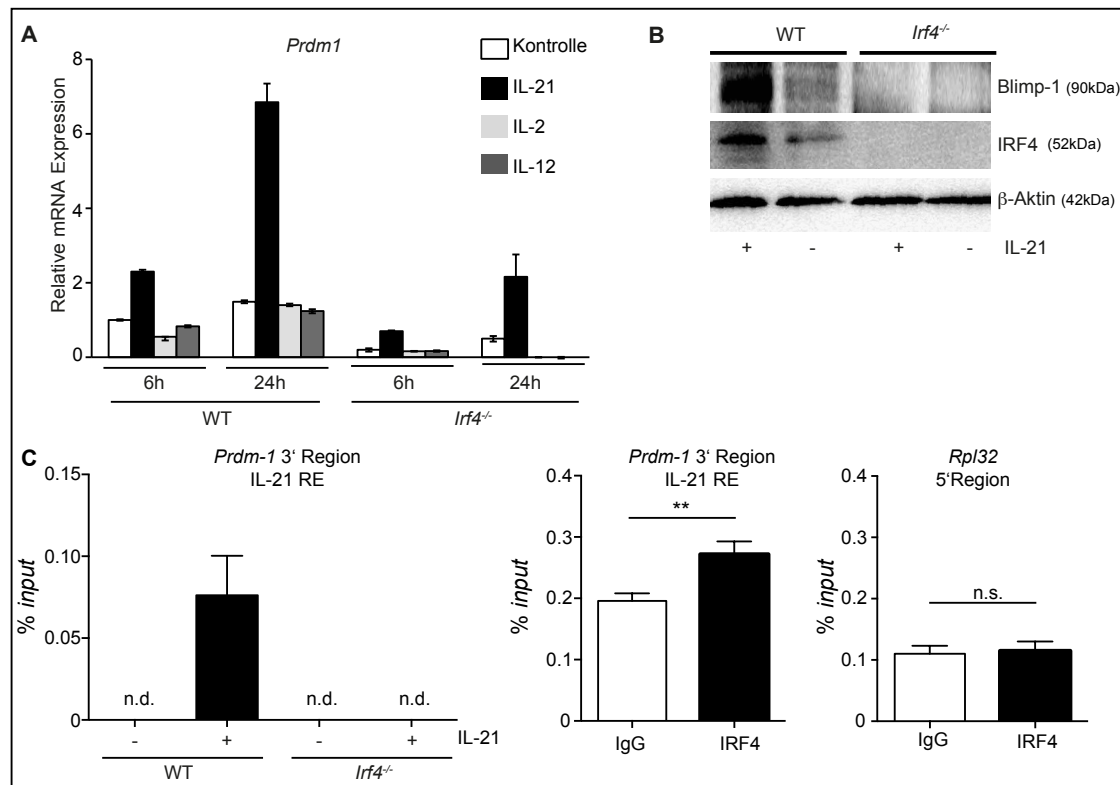


Abb. 4. 15 BLIMP1-Expression in CD8⁺ T-Zellen. (A) Aufgereinigte WT und *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen wurden für 3 Tage mit anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 voraktiviert. Nach einer 24-stündigen Ruhephase erfolgte die Supplementierung mit IL-2, IL-12 oder IL-21. Nach 6 h bzw. 24 h wurde aus diesen Ansätzen die *Prdm1*-Expression via qRT-PCR analysiert. Die Balken geben den Mittelwert und die Standardabweichung der PCR-Duplikate an. (B) Wie in (A) wurden voraktivierte WT und *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nach einer 24-stündigen Ruhephase für 24 h mit und ohne IL-21 kultiviert. Anschließend erfolgte die Detektion der BLIMP-1, IRF4- und β-Aktin-Expression mittels WB. (C) Für die ChIP-Analysen wurden voraktivierte WT und *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen für 1 h mit bzw. ohne IL-21 behandelt. *Input*-DNA und präzipitierte DNA wurden durch qRT-PCR quantifiziert. Dabei wurden Primerpaare spezifisch für regulatorische Regionen von *IL-21* RE bzw. die regulatorische Region der Kontrollsequenz von *Rpl 32* eingesetzt; das gleiche Chromatin wurde für ein Kontroll-ChIP-Experiment mit Kontroll-IgG verwendet. Die präzipitierte DNA ist im relativen Vergleich zum *Input* (% *input*) angegeben. (linker Graph) Unspezifische Bindungen (detektiert durch Verwendung von Kontroll-IgG) wurden subtrahiert; n.d.= nicht detektierbar; dargestellt ist der Mittelwert (± Standardfehler) von Triplikaten eines Experiments. (mittlerer Graph) ChIP von IRF4 und Kontroll-IgG von WT CD8⁺ T-Zellen nach einstündiger Stimulation mit IL-21. (rechter Graph) ChIP von IRF4 und Kontroll-IgG von WT CD8⁺ T-Zellen nach einstündiger IL-21-Stimulation. (mittlerer und rechter Graph) Mittelwert (± Standardfehler) von Triplikaten eines Experiments. Alle Experimente wurden mind. zweimal in voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt und bestätigt.

Ohne Zytokinzugabe (Kontrolle) zeigen *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nach 6 h bzw. 24 h auf mRNA-Ebene eine reduzierte *Prdm1*-Expression im Vergleich zu WT CD8⁺ T-Zellen. Die Zugabe der Zytokine IL-2 und IL-12 kann die *Prdm1*-Expression in beiden Zellpopulationen nicht verstärken. Im Gegensatz dazu wird 24 h nach Zugabe von IL-21 in WT CD8⁺ T-Zellen die *Prdm1*-Expression sehr stark induziert, während in *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nur eine minimale Verstärkung der *Prdm1*-Expression detektierbar ist (A). Die qRT-PCR wurde von Anna Guralnik durchgeführt.

Die Analyse der BLIMP1-Expression auf Proteinebene zeigt, dass die 24-stündige Supplementierung von IL-21 in voraktivierten WT CD8⁺ T-Zellen zu einer verstärkten Expression von IRF4 und gleichzeitig zu einer Hochregulierung der BLIMP1-Expression führt, während in *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen eine BLIMP1-Expression nicht nachweisbar ist (B). Die Durchführung der WB-Experimente erfolgte mit Hilfe von Anna Guralnik.

In B- und CD4⁺ T-Zellen wurde bereits eine IL-21 vermittelte BLIMP1-Induktion durch die Bindung von IRF4 an ein IL-21 responsives Element (RE) in der 3' Region des *Prdm1* Gens gezeigt (Kwon et al., 2009). Die ChIP-Analyse der WT CD8⁺ T-Zellen (C) zeigt, dass IRF4 in WT CD8⁺ T-Zellen nach einstündiger Inkubation mit IL-21 an das IL-21 RE bindet (linker Graph). Die Präzipitation mit dem IRF4-Ak in WT CD8⁺ T-Zellen führt zu einer Anreicherung der IL-21 RE-Sequenz von *Prdm1* im Vergleich zu der Kontrollpräzipitation mit dem IgG-Ak (mittlerer Graph). Es ist keine verstärkte IRF4-Bindung in der Kontrollsequenz (5' Region von *Rpl32*) zu detektieren (rechter Graph). Die Durchführung der ChIP Experimente und der qRT-PCR wurden von Angelina Neumann und Anna Guralnik unterstützt.

Diese Daten zeigen, dass IRF4 in CD8⁺ T-Zellen nach IL-21-Stimulation spezifisch an das IL-21 RE 3' vom Promotor des *Prdm1*-Gens bindet. Es kann infolgedessen angenommen werden, dass die BLIMP1-Expression in Abhängigkeit von IRF4 erfolgt.

4.1.10 IRF4 ist essentiell für die CD8⁺ Gedächtniszellentwicklung

Die erhöhte Expression der phänotypischen Marker CD44 und CD62L und die fehlende KLRG1-Expression in *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen, sowie die verstärkte mRNA-Expression von *Eomes*, *Bcl6* und *Id3* zum Zeitpunkt der akuten Listeriose, gaben Anlass zu der Hypothese, dass eine IRF4-Defizienz während einer Listerieninfektion die Bildung von CD8⁺ Gedächtniszellen fördert. Gedächtniszellen besitzen das Potential bei einer Infektion mit dem gleichen Antigen schnell und stark zu proliferieren und zu sehr potenten Effektorzellen zu differenzieren.

Um diese Hypothese zu klären, wurden OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Mäuse mit 1x10⁵ CFU *Lm* Ova i.p. infiziert und 40 Tage später wurde, wie bereits in vorherigen Versuchen beschrieben, die Bakterienlast in der Milz, sowie die Anzahl der Ova₂₅₇₋₂₆₄-Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen in Milz, Leber und KM bestimmt (Abb. 4.16).

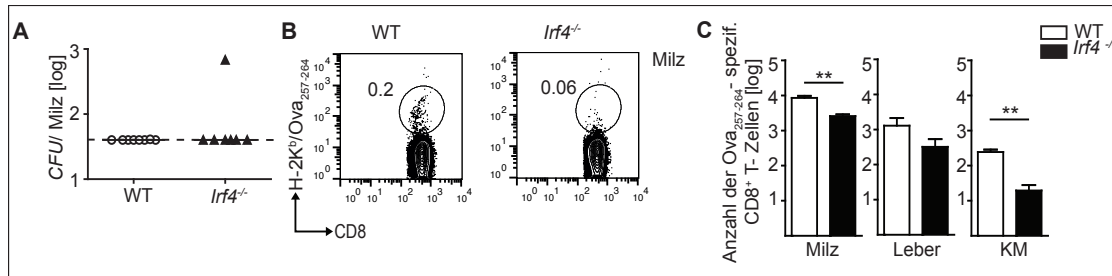


Abb. 4.16 Titer- und Frequenzbestimmung der antigenspezifischen OT-I und *Irif4*^{-/-} OT-I CD8⁺ T-Zellen. (A-C) OT-I und *Irif4*^{-/-} OT-I Mäuse wurden mit 1×10^5 CFU *Lm* Ova i.p. infiziert und 40 Tage später analysiert. (A) CFU-Bestimmung in der Milz. Gezeigt sind die individuellen Mäuse/Gruppe und der Median von 2 miteinander kombinierten, voneinander unabhängigen Experimenten (n=8). Die gestrichelte Linie gibt das Detektionslimit an. (B) Repräsentatives Konturdiagramm der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz (n=4). Die isolierten Milzzellen wurden mit dem Ova₂₅₇₋₂₆₄-Dextramer und anschließend mit anti-CD8 gefärbt und via FACS analysiert. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der H-2K^b/Ova₂₅₇₋₂₆₄ Dextramer⁺ CD8⁺ Zellpopulation an. (C) Anzahl der H-2K^b/Ova₂₅₇₋₂₆₄ Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen in Milz, Leber und KM. Es ist der Mittelwert und Standardfehler angegeben, n=4. (A-C) Die Experimente wurden zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

WT und *Irif4*^{-/-} OT-I Mäuse weisen 40 Tage p.i. keine Listerienkolonien in der Milz auf (A). Während in den Organen der *Irif4*^{-/-} OT-I Mäuse nur marginale Level an Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen nachweisbar sind, zeigte sich in den Organen der OT-I Mäuse jeweils geringe Frequenzen an Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen (B & C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch die Bildung von peptidspezifischen CD8⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit von IRF4 erfolgt.

Eine IRF4-Defizienz führt zu einer stark eingeschränkten CD8⁺ Effektor T-Zellantwort 6 Tage p.i. . Im nächsten Schritt wurde daher analysiert, ob die Funktion von *Lm* Ova-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auch 40 Tage p.i. IRF4-abhängig ist. Dafür wurden Milzzellen aus infizierten OT-I und *Irif4*^{-/-} OT-I Mäuse isoliert und für 5 h mit bzw. ohne SIINFEKL und BrefeldinA stimuliert. Anschließend folgte die Färbung der Zelloberfläche mit anti-CD8 und die intrazelluläre Färbung mit anti-IFN γ und anti-TNF α (Abb. 4.17).

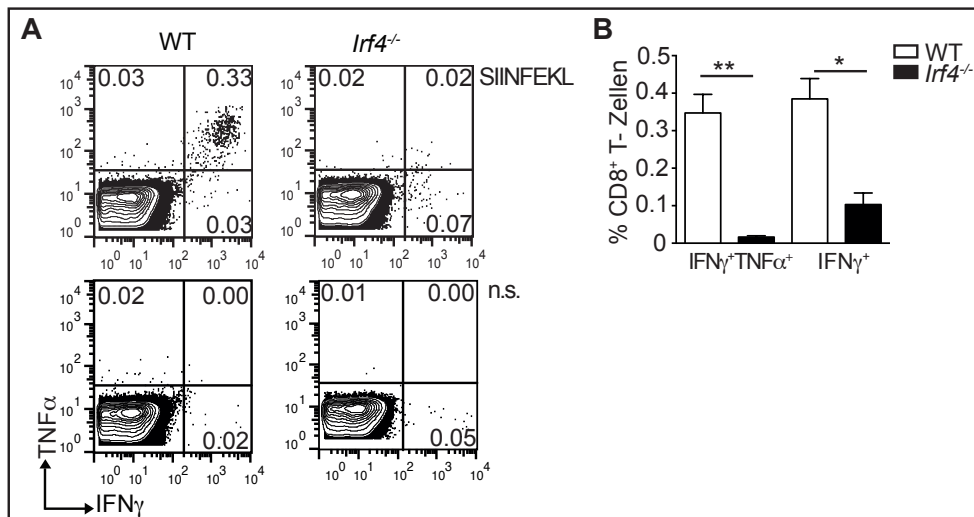


Abb. 4.17 Zytokinproduktion der OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I CD8⁺ T-Zellen 40 Tage nach *Lm* Ova-Infektion. OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Mäuse wurden mit 1×10^5 CFU *Lm* Ova i.p. infiziert und 40 Tage später wurden Milzzellen dieser Mäuse isoliert und mit bzw. ohne SIINFEKL und BrefeldinA für 5 h restimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung mit anti-CD8 und die intrazelluläre Färbung mit anti-IFN γ und anti-TNF α . (A) Die FACS-Abbildung zeigt ein repräsentatives Konturdiagramm der IFN γ - und TNF α -Produktion der CD8⁺ T-Zellen. Obere Reihe mit SIINFEKL-Restimulation, untere Reihe unstimulierte (n.s.) Zellen. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation an. (B) Die Graphen geben den Mittelwert und Standardfehler der Prozente der positiven Zellen von 4 Mäusen/Gruppe an. Die Experimente wurden dreimal wiederholt und bestätigt.

Irf4^{-/-} OT-I Zellen produzieren nach Restimulation mit SIINFEKL im Gegensatz zum WT nur Hintergrundlevel an IFN γ und TNF α (A&B). Diese Daten weisen darauf hin, dass IRF4 anscheinend sowohl die Funktion der CD8⁺ Effektor T-Zellen, als auch die Funktion der CD8⁺ Gedächtniszellen reguliert.

Aufgrund der Tatsache, dass die Bildung und Funktion von endogenen CD8⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit von IRF4 erfolgt, sollte nun verifiziert werden, ob es sich dabei um einen intrinsischen Defekt der *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen handelt, wie es zum Zeitpunkt der akuten Listeriose der Fall ist. Daher wurde die Frequenz und Anzahl, sowie die Zytokinproduktion der CD8⁺ T-Zellen im Transfermodell analysiert. Jeweils 4×10^4 OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I CD8⁺ T-Zellen (Ly5.1⁺) wurden in Ly5.1⁺ Mäuse i.v. transferiert, die anschließend mit 1×10^5 CFU *Lm* Ova i.p. infiziert wurden. 40 Tage p.i. wurden die transferierten Zellen analysiert (Abb. 4.18).

Für die Frequenzanalyse wurden Milz- und Leberzellen der infizierten Rezipienten isoliert, die Oberfläche mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt, durchflusszytometrisch analysiert und anschließend statistisch ausgewertet (A). Um die Produktion der Zytokine IFN γ , TNF α und IL-2 in den transferierten OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen zu messen, wurden isolierte Milzzellen aus den Rezipienten mit bzw. ohne SIINFEKL und

BrefeldinA für 5 h restimuliert. Nachfolgend wurde die Oberfläche mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt, gefolgt von der intrazellulären Färbung mit anti-IFN γ und anti-TNF α bzw. mit anti-IL-2 sowie anschließender FACS-Analyse und statistischer Auswertung (B-E).

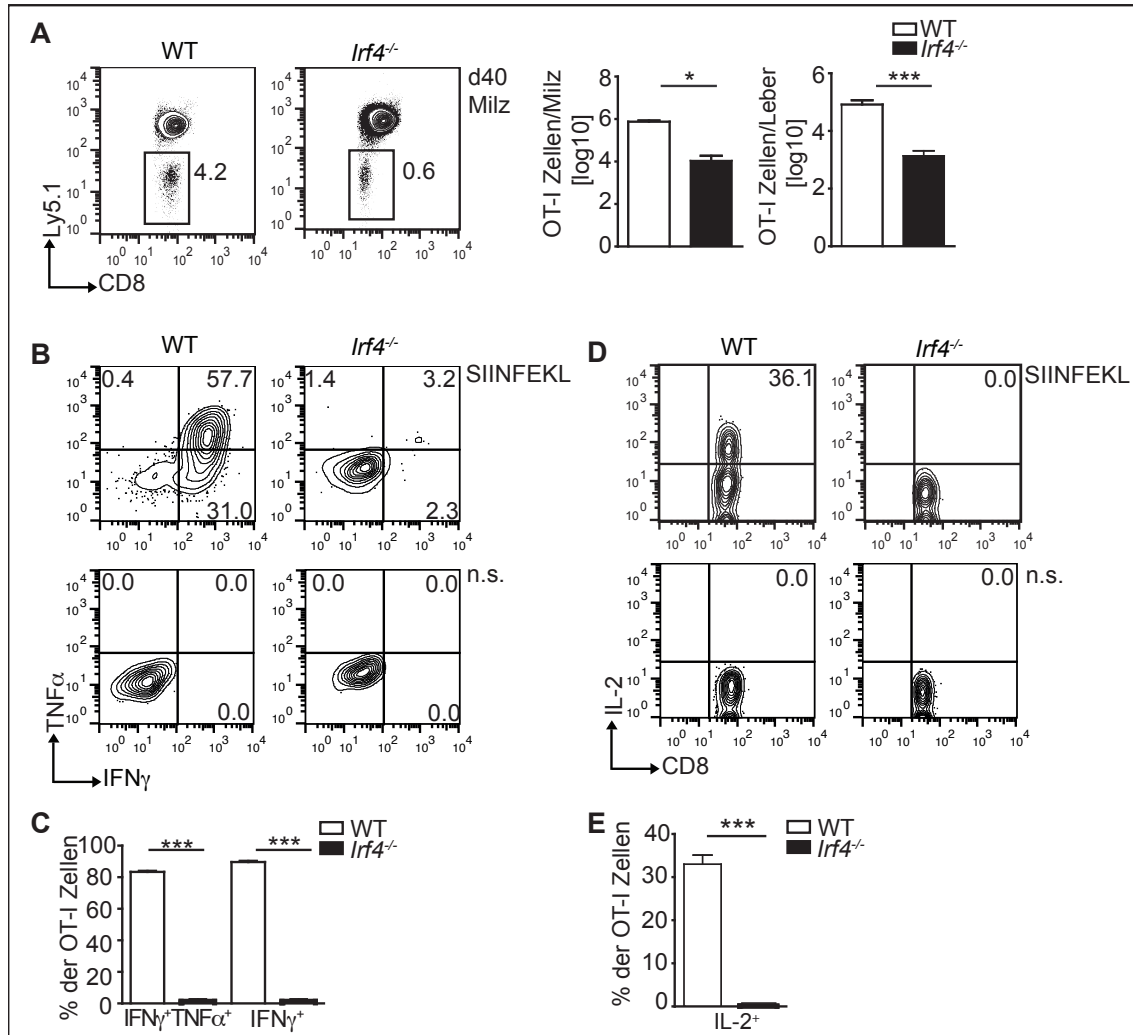


Abb. 4.18 Proliferation und Zytokinproduktion von transferierten OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen an Tag 40 p.i. . (A-C) 4x10⁴ aufgereinigte CD8⁺ T-Zellen aus Ly5.1⁻ OT-I und *Irf4*^{-/-} OT-I Mäusen wurden in Ly5.1⁺ Mäuse i.v. transferriert, anschließend wurden die Rezipienten mit 1x10⁵ CFU *Lm* Ova i.p. infiziert. An Tag 40 p.i. erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der transferierten Zellen. (A) Die aus Rezipienten isolierten Milz- und Leberzellen wurden mit anti-CD8 und anti-Ly5.1 gefärbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Konturdiagramm von CD8⁺ Ly5.1⁺ Milzzellen. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der eingegrenzten Population an. Statistische Auswertung der CD8⁺ Ly5.1⁺ Zellzahl aus Milz- und Leberzellen. Es ist der Mittelwert und Standardfehler von 4 Mäusen/ Gruppe angegeben. (B & C) Gesamtzellen aus der Milz wurden mit bzw. ohne SIINFEKL und BrefeldinA für 5 h restimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung mit anti-CD8 und anti-Ly5.1, gefolgt von der intrazellulären Färbung mit anti-IFN γ und anti-TNF α bzw. mit anti-IL-2. Jeweils obere Reihe mit SIINFEKL-Restimulation, untere Reihe unstimulierte (n.s.) Zellen. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation an. Die Graphen geben den Mittelwert und Standardfehler der Prozente der positiven Zellen von 4 Mäusen/Gruppe an. Die Experimente wurden mind. zweimal wiederholt und bestätigt.

Auch im Transfermodell ist nur eine sehr geringe Frequenz und Anzahl an *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen in der Milz und Leber der infizierten Rezipienten, im Vergleich zu den

transferierten OT-I Zellen, zu detektieren (A). Infolge der Peptidstimulation ist eine Zytokinproduktion in *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen kaum bzw. nicht nachweisbar. *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen produzieren deutlich geringere Mengen an IFN γ und TNF α im Vergleich zu OT-I Zellen (B & C). Ein typisches Merkmal für Gedächtniszellen ist eine vermehrte IL-2-Produktion. Übereinstimmend mit der Hypothese, dass auch die Gedächtniszellbildung IRF4-abhängig erfolgt, sind *Irf4*^{-/-} OT-I Zellen kaum in der Lage IL-2 zu produzieren (D & E).

Diese Ergebnisse deuten somit daraufhin, dass IRF4 auch die Entwicklung von langlebigen CD8⁺ Gedächtniszellen beeinflusst. In Abwesenheit von IRF4 ist nur eine geringe Anzahl an CD8⁺ T-Zellen detektierbar, die durch eine geringe Zytokinproduktion gekennzeichnet sind.

Teil II

4.2 Der Einfluss von IRF9 auf CD8⁺ T-Zellen während einer akuten LCMV-Infektion

4.2.1 IRF9 beeinflusst die Akkumulation und den Phänotyp von LCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Infolge einer viralen Infektion werden Typ I IFN produziert und der ISGF3-Komplex wird aktiviert. Dadurch wird die Expression von antiviralen Genen und eine starke CD8⁺ T-Zellantwort induziert (Moseman and McGavern, 2013). Da *Stat1*^{-/-} und *Stat2*^{-/-} Mäuse sehr anfällig gegenüber viralen Infektionen sind (Chen et al., 2009; Hahm et al., 2005; Hofer et al., 2012; Park et al., 2000), stellte sich die Frage, ob die Typ I IFN-vermittelte Antwort und insbesondere die CD8⁺ Effektor T-Zellantwort bei einer LCMV Arm-Infektion in Abhängigkeit von IRF9 erfolgt.

Um dies zu klären, wurden zunächst WT und *Irif9*^{-/-} Mäuse mit 1000 PFU des LCMV Arm i.p. infiziert, um im Weiteren die Frequenz der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt einer akuten Infektion zu analysieren (Alle LCMV-Infektionen und die Entnahme der Milzen wurden von PD Dr. Markus J. Hofer durchgeführt.). An Tag 8 p.i. wurden Milzzellen der infizierten WT und *Irif9*^{-/-} Mäuse isoliert und mit den fluoreszenzgekoppelten MHC-I Dextrameren H-2D^b/GP₃₃₋₄₁, H-2D^b/NP₃₉₆₋₄₀₄ sowie anti-CD8 gefärbt. Anschließend wurde die Frequenz der LCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im FACS analysiert und statistisch ausgewertet. Als Negativkontrolle dienten isolierte Milzzellen aus naiven Mäusen. Die Verwendung von 2 verschiedenen LCMV-spezifischen MHC-I Dextrameren sollte die Reaktion auf Oberflächen- (Glykoprotein, GP) und Nukleoproteine (NP), die an Nukleinsäuren binden, zeigen (Abb. 4.19).

In naiven WT und *Irif9*^{-/-} Mäusen sind keine LCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektierbar. An Tag 8 p.i. ist jedoch zu beobachten, dass die Menge der CD8⁺ T-Zellen aus *Irif9*^{-/-} Mäusen im Vergleich zum WT reduziert ist. Dabei sind die GP₃₃₋₄₁-spezifischen um das zweifache und die NP₃₉₆₋₄₀₄-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

der *Irf9*^{-/-} Mäuse um mehr als das zehnfache reduziert (A). Sowohl die Gesamtmenge an CD8⁺ T-Zellen, als auch die Anzahl der GP- und NP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist in *Irf9*^{-/-} Mäusen signifikant geringer als im WT (B).

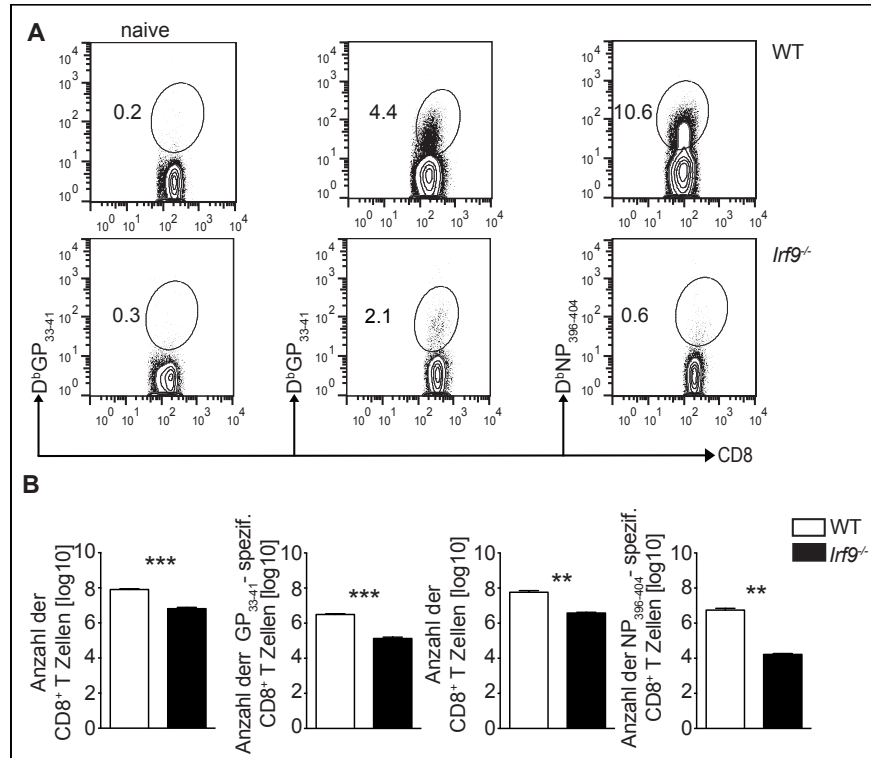


Abb. 4. 19 Frequenzanalyse der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen aus WT und *Irf9*^{-/-} Mäusen p.i. WT und *Irf9*^{-/-} Mäuse wurden mit 1000 PFU LCMV Arm i.p. infiziert und 8 Tage p.i. wurden Milzzellen von je 5 Mäusen/Gruppe mit Dextrameren spezifisch für das GP₃₃₋₄₁- bzw. das NP₃₉₆₋₄₀₄-Epitop und anschließend mit anti-CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A-C) Repräsentative Konturdiagramme von naiven H-2D^b/GP₃₃₋₄₁ Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen (A), bzw. H-2D^b/GP₃₃₋₄₁ Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen (B) und H-2D^b/NP₃₉₆₋₄₀₄ Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen an Tag 8 p.i. (C). Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der eingegrenzten Population an. (D) Anzahl der Gesamt-CD8⁺ T-Zellen und der H-2D^b/GP₃₃₋₄₁ bzw. der H-2D^b/NP₃₉₆₋₄₀₄ Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen von WT und *Irf9*^{-/-} Mäusen. Angeben ist der Mittelwert und der Standardfehler, n=5. Die P-Werte wurden mit Hilfe des Student's *t* Test ermittelt, ** entspricht P < 0,01, *** entspricht P < 0,001. Die Experimente wurden zweimal mit konsistenten Ergebnissen durchgeführt.

Somit weisen antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen aus *Irf9*^{-/-} Mäusen 8 Tage nach der LCMV Arm-Infektion deutliche Akkumulationsdefekte auf.

Während einer LCMV-Infektion wird die T-Zellantwort durch Typ I IFN gefördert. Die Unfähigkeit auf Typ I IFN zu reagieren, führt zu einer verringerten Expansion (Aichele et al., 2006; Andrews et al., 2010; Kolumam et al., 2005; Yokoyama, 1995) und veränderten Differenzierung der antiviralen T-Zellen (Wiesel et al., 2012). Um im nächsten Schritt die Oberflächenexpression von speziellen Aktivierungsmarkern zu untersuchen, wurden Milzzellen aus LCMV Arm-infizierten *Irf9*^{-/-} und WT Mäusen an Tag 8 p.i. mit dem fluoreszenzgekoppelten MHC-I Dextramer H-2D^b/GP₃₃₋₄₁,

anti-CD8, anti-CD44 und anti-KLRG1 gefärbt und durchflusszytometrisch sowie statistisch ausgewertet (Abb. 4.20). Die Durchführung der Färbungen und Messungen erfolgten mit Unterstützung von Anna Guralnik.

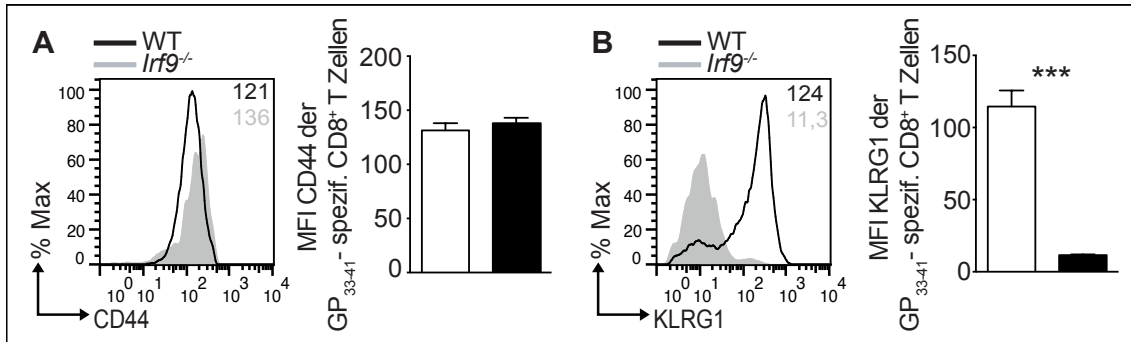


Abb. 4. 20 Analyse von Aktivierungsmarkern der GP₃₃₋₄₁-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus WT und *Irf9*^{-/-} Mäusen. (A&B) An Tag 8 p.i. (1000 PFU LCMV Arm i.p.) wurden Milzzellen aus WT und *Irf9*^{-/-} Mäusen isoliert und *ex vivo* mit dem MHC-I Dextramer H-2D^b/GP₃₃₋₄₁ und mit Ak gegen CD8, CD44 und KLRG1 gefärbt und via FACS analysiert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme und die Zahlenwerte geben die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD44 (A) und KLRG1 (B) der H-2D^b/GP₃₃₋₄₁-Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen an. Das Experiment wurde zweimal mit 5 Mäusen/Gruppe mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt

Die Hochregulation von CD44 bei GP₃₃₋₄₁-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus *Irf9*^{-/-} Mäusen indiziert, dass diese Zellen auf die LCMV-Infektion reagiert haben. *Irf9*^{-/-} Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen sind jedoch nicht in der Lage einen für Effektorzellen charakteristischen KLRG1^{hi}-Phänotyp zu erwerben. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass IRF9 sowohl für die Akkumulation von LCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wichtig ist, als auch für die Bildung von terminal differenzierten KLRG1^{hi} CD8⁺ Effektor T-Zellen in Antwort auf eine akute LCMV-Infektion.

4.2.2 IRF9 verhindert die Erschöpfung von CD8⁺ T-Zellen

Da *Irf9*^{-/-} Mäuse nach einer LCMV-Infektion nur eine geringe Anzahl antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen mit verändertem Phänotyp generieren, stellte sich die Frage, ob IRF9 auch die funktionellen Eigenschaften dieser Zellen beeinflusst. Um dies zu klären, wurde die LCMV-spezifische Zytokinproduktion an Tag 8 p.i. analysiert. Dafür wurden Milzzellen aus WT und *Irf9*^{-/-} Mäusen isoliert und mit dem Peptid GP₃₃₋₄₁ sowie BrefeldinA restimuliert. Als Kontrolle wurden Milzzellen nur mit BrefeldinA restimuliert (n.s.). Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der CD8⁺ T-Zellen auf die Produktion von IFN γ , TNF α und IL-2 (Abb. 4.21). Die Durchführung der Färbungen und Messungen erfolgten mit Unterstützung von Anna Guralnik.

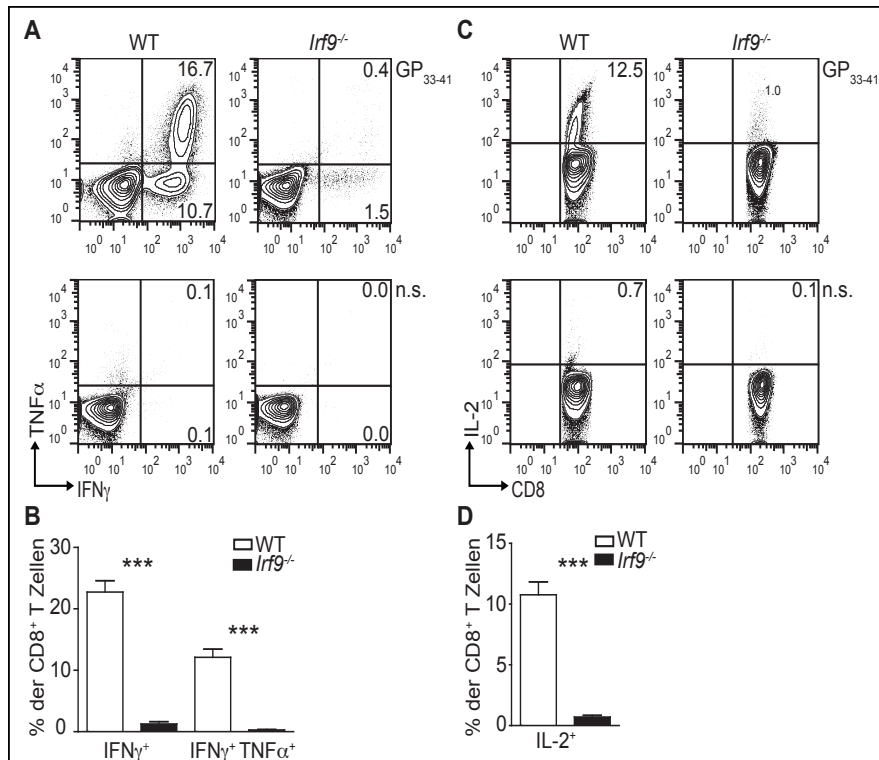


Abb. 4. 21 Zytokinproduktion der WT und *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen aus LCMV-infizierten Mäusen. (A-D) An Tag 8 p.i. wurden Milzzellen der WT und *Irf9*^{-/-} Mäuse isoliert und für 5 h mit GP₃₃₋₄₁ und BrefeldinA bzw. ohne GP₃₃₋₄₁ (n.s.) restimuliert. Die Zelloberfläche wurde mit anti-CD8 gefärbt. Anschließend folgte die intrazelluläre Zytokinfärbung mit anti-IFN γ , anti-TNF α und anti-IL-2. Dargestellt sind repräsentative Konturdiagramme und die Produktion von IFN γ und TNF α (A) bzw. IL-2 (C) der CD8⁺ T-Zellen. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil der eingegrenzten Zellpopulation an. Die Graphen zeigen die IFN γ ⁺, IFN γ ⁺ und TNF α ⁺ (B) bzw. die IL-2⁺ (D) der ausschließlich mit GP₃₃₋₄₁ und BrefeldinA restimulierten CD8⁺ T-Zellen und stellen den prozentualen Mittelwert und den Standardfehler dar (n=5). Die P-Werte wurden mittels *Student's t* Test ermittelt, *** = P < 0,001. Die Experimente wurden zweimal mit 5 Mäusen/ Gruppe mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

WT CD8⁺ T-Zellen produzieren deutliche Mengen an IFN γ , TNF α und IL-2, während in *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nur Hintergrundlevel an Zytokinen detektierbar sind.

CD8⁺ Effektor T-Zellen induzieren die Apoptose von infizierten Zellen, indem sie zytotoxische Moleküle wie Granzyme und Perforin über die immunologische Synapse direkt in die Zellen sezernieren, wodurch zelleigene Mechanismen zur Apoptose eingeschaltet werden (Trapani and Smyth, 2002). Um den Einfluss von IRF9 auf die Produktion von zytotoxischen Molekülen zu untersuchen, wurden Milzzellen von LCMV-infizierten WT und *Irf9*^{-/-} Mäusen *ex vivo* durchflusszytometrisch auf die Expression von GranzymB analysiert. Weiterhin wurden aus Milzzellen der infizierten WT und *Irf9*^{-/-} Mäuse GP₃₃₋₄₁⁺ CD8⁺ T-Zellen *ex vivo* sortiert und die mRNA-Expression von GranzymB (*Gzmb*), GranzymK (*Gzmk*) und Perforin1 (*Prfl*) wurde mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. 4.22). Die Durchführung der Aufreinigung und

Färbung wurde von Anna Guralnik und Bärbel Camara (MTA) unterstützt. Anna Guralnik führte auch die qRT-PCR durch.

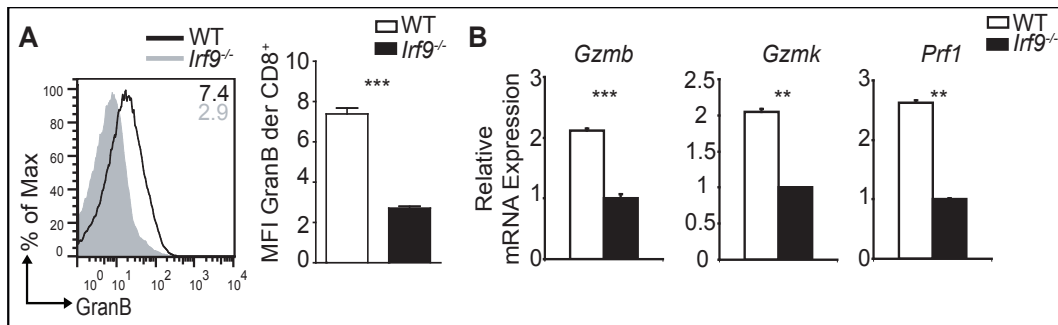


Abb. 4. 22 Analyse der zytotoxischen Moleküle der WT und *Irif9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. (A & B) WT und *Irif9*^{-/-} Mäuse wurden mit LCMV Arm infiziert und 8 Tage später wurden Milzzellen isoliert. (A) Die Zelloberfläche wurde *ex vivo* mit anti-CD8 gefärbt, gefolgt von einer intrazellulären Färbung mit anti-GranB. Das Histogramm zeigt die GranB-Expression von CD8⁺ T-Zellen mit der MFI der jeweiligen Zellpopulation. Die Graphen stellen den MFI Mittelwert und Standardfehler von GranB der CD8⁺ T-Zellen dar (n=5). Die P-Werte wurden mittels *Student's t* Test ermittelt, *** = P < 0,001. (B) Aus Milzzellen wurden CD8⁺ Zellen negativ aufgereinigt und mit dem MHC-I Dextramer H-2D^b/GP₃₃₋₄₁ und anti-CD8 gefärbt. Es folgte die Zellsortierung der H-2D^b/GP₃₃₋₄₁⁺CD8⁺ T-Zellen, die anschließend auf die *GranB*, *GranK* und *Prf1* mRNA-Expression via qRT-PCR analysiert wurden. Die Werte wurden mit denen von *Hprt* verglichen. Der niedrigere Wert wurde bei der Auswertung jeweils auf 1 gesetzt. Die Balken entsprechen der Standardabweichung von pipettierten Duplikaten der gleichen Probe. Die Experimente wurden zweimal mit 10 Mäusen/Gruppe mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt

Irif9^{-/-} CD8⁺ T-Zellen zeigen eine sehr geringe GranzymB-Produktion (A), und stark reduzierte mRNA-Expressionslevel von *Gzmb*, *Gzmk* und *Prf1* im Vergleich zum WT (B).

In Übereinstimmung mit der stark verminderten Akkumulation und KLRG1-Expression, weisen *Irif9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen Defekte in der Produktion von Zytokinen und zytotoxischen Molekülen auf. Dies weist daraufhin dass IRF9 für die Ausbildung einer regulären CD8⁺ Effektor T-Zellantwort als Reaktion auf eine akute LCMV-Infektion wichtig ist.

Der Verlust der Effektorfunktion und der zytotoxischen Aktivität wird bei CD8⁺ T-Zellen mit dem Zustand der Erschöpfung assoziiert (Wherry, 2011; Zajac et al., 1998). Erschöpfte CD8⁺ T-Zellen sind phänotypisch durch die verstärkte Expression von inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 und LAG-3 und dem Oberflächenmarker CD25 charakterisiert (Legat et al., 2013; Wherry, 2011). Daher wurde im folgenden Experiment die Oberflächenexpression dieser Marker analysiert. Dafür wurden Milzzellen der infizierten WT und *Irif9*^{-/-} Mäuse isoliert und die Zelloberfläche wurde mit dem Dextramer H-2D^b/GP₃₃₋₄₁, anti-CD8, anti-PD-1, anti-LAG-3 und anti-CD25 gefärbt und durchflusszytometrisch und statistisch ausgewertet. (Abb. 4.23). Die

Durchführung der Färbungen und Messungen erfolgten mit Unterstützung von Anna Guralnik.

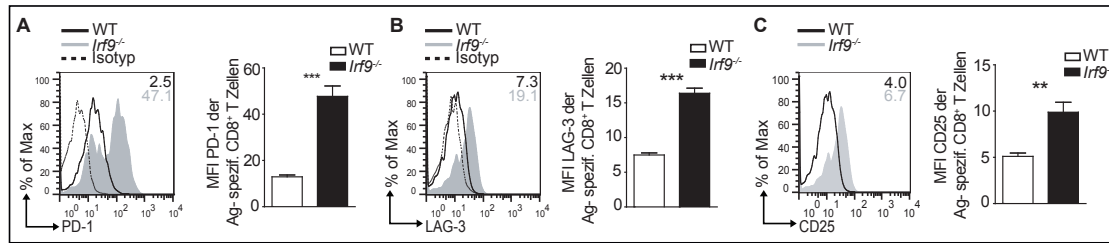


Abb. 4.23 PD-1- und LAG-3-Expression von LCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus WT und *Irf9*^{-/-} Mäusen. (A-C) An Tag 8 p.i. wurden Milzzellen aus WT und *Irf9*^{-/-} Mäuse isoliert und *ex vivo* mit dem Dextramer H-2D^b/GP₃₃₋₄₁, anti-CD8, anti-PD-1 bzw. anti-LAG-3 und anti-CD25 gefärbt und via FACS analysiert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme. Die Zahlenwerte geben die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von PD-1 (A), LAG-3 (B) und CD25 (C) der H-2D^b/GP₃₃₋₄₁-Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen an. (A-C) Die graphische Darstellung gibt den Mittelwert und den Standardfehler der MFI für PD-1, LAG-3 und CD25 an, n=5. Die P-Werte wurden mit Hilfe des *Student's t* Test ermittelt, *** entspricht P < 0,001. Das Experiment wurde zweimal mit 5 Mäusen/Gruppe mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt

LCMV-spezifische *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen exprimieren eine um das zwanzigfache erhöhte Menge an PD-1 und LAG-3 im Vergleich zu WT CD8⁺ T-Zellen. Auch die CD25-Expression, die in erschöpften Zellen mit der PD-1-Expression korreliert (Buggert et al., 2014), ist in *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen erhöht. Diese Daten sind ein Hinweis darauf, dass CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit von IRF9 während einer akuten Infektion in den Zustand der Erschöpfung übergehen.

Erschöpfte CD8⁺ T-Zellen sind nicht in der Lage das Pathogen vollständig zu eliminieren. Daher sind sie dem Antigen und der Entzündung über einen verlängerten Zeitraum ausgesetzt und durchlaufen währenddessen keine typische Kontraktionsphase (Utzschneider et al., 2013). Es ist bekannt, dass BIM, ein proapoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie, die Apoptose der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen während einer akuten und chronischen Infektion reguliert (Grayson et al., 2006). BCL2 ist wichtig für das Überleben von CD8⁺ T-Zellen und die mRNA-Expression in CD8⁺ Effektor T-Zellen und erschöpften CD8⁺ T-Zellen ist gleich (Wherry et al., 2007). Für den TF TBX21 konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression in erschöpften Zellen invers mit der PD-1-Expression korreliert (Kao et al., 2011). Um zu klären, ob IRF9 auch auf transkriptioneller Ebene die CD8⁺ T-Zellerschöpfung beeinflusst, wurden 8 Tage nach der LCMV-Infektion H-2D^b/GP₃₃₋₄₁⁺ CD8⁺ Zellen aus den Milzen von WT und *Irf9*^{-/-} Mäusen sortiert. Mittels qRT-PCR erfolgte die Analyse der mRNA-Expression der TF BCL2 und TBX21 (*Bcl2* und *Tbx21*) (Abb. 4.24). Die Durchführung der

Aufreinigung und Färbung der Zellen wurden von Anna Guralnik und Bärbel Camara unterstützt. Anna Guralnik führte auch die qRT-PCR durch.

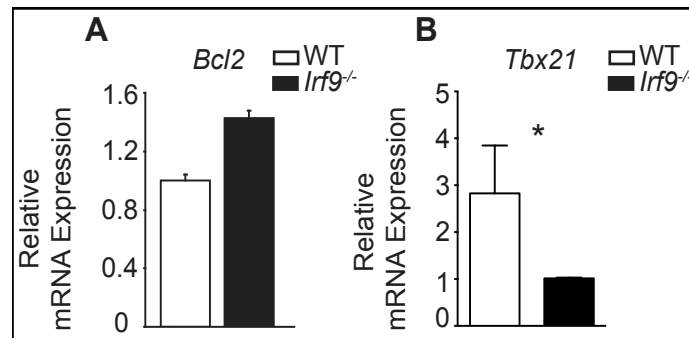


Abb. 4.24 *Bcl2* und *Tbx21* mRNA-Expression in CD8⁺ T-Zellen aus WT und *Irf9*^{-/-} Mäusen p.i. (A & B) WT und *Irf9*^{-/-} Mäuse wurden mit 1000 PFU LCMV i.p. infiziert. An Tag 8 p.i. wurden Milzen präpariert, CD8⁺ T-Zellen negativ aufgereinigt und anschließend mit dem Dextramer H-2D^b/GP₃₃₋₄₁ und anti-CD8 gefärbt. Die H-2D^b/GP₃₃₋₄₁⁺ CD8⁺ Zellpopulation wurde sortiert und daraus wurde RNA isoliert, aus der anschließend cDNA für die qRT-PCR Analyse synthetisiert wurde. Die mRNA-Expression von *Bcl2* (A) und *Tbx21* (B) wurde analysiert. Die Werte wurden mit denen von *Hprt* verglichen und der geringere Wert wurde bei der Auswertung auf 1 gesetzt. Die Balken entsprechen der Standardabweichung von Duplikaten der gleichen Probe.

Es sind keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von BCL2 in WT und *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen detektierbar. Die mRNA-Expression von TBX21 ist in *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zum WT stark vermindert. Eine verminderte TBX21-Expression wird mit einem KLRG1^{lo}-Phänotyp und dem Zustand der Erschöpfung assoziiert.

In ihrer Gesamtheit demonstrieren diese Daten, dass IRF9 eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zellerschöpfung spielt.

4.2.3 CD8⁺ T-Zellen aus *Irf9*^{-/-} Mäusen halten den Zustand der Erschöpfung 30 Tage nach der LCMV-Infektion aufrecht

CD8⁺ T-Zellen weisen in Abwesenheit von IRF9 an Tag 8 einer akuten LCMV-Infektion phänotypische und funktionelle Merkmale von erschöpften Zellen auf. Diese Charakteristika sind für chronische Infektionen beschrieben, bei denen keine konventionellen CD8⁺ Gedächtniszellen gebildet werden (Durbin et al., 2000; Wherry, 2011; Wherry et al., 2007; Zajac et al., 1998). Daher sollte im Folgenden analysiert werden, ob *Irf9*^{-/-} Mäuse 30 Tage nach LCMV Arm-Infektion eine erschöpfte CD8⁺ T-Zellantwort aufrecht erhalten. Dafür wurden zunächst Milzzellen der infizierten WT und *Irf9*^{-/-} Mäuse isoliert und die Frequenz der GP₃₃₋₄₁- sowie NP₃₉₆₋₄₀₄-spezifischen

CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe der Dextramerfärbung via FACS ermittelt und statistisch ausgewertet (Abb. 4.25).

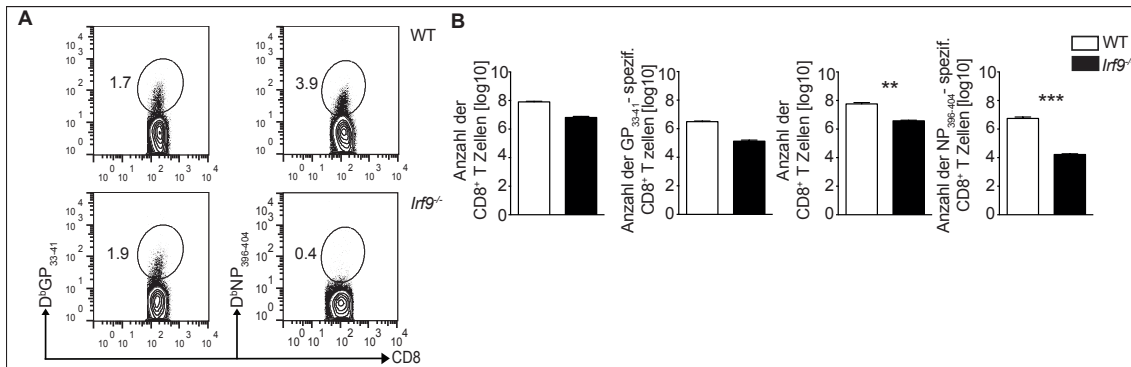


Abb. 4. 25 Frequenzanalyse der antigenspezifischen WT und *Irif9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen p.i. . WT und *Irif9*^{-/-} Mäuse wurden mit 1000 PFU LCMV Arm i.p. infiziert und an Tag 30 p.i. wurden Milzzellen von je 5 Mäusen/Gruppe mit Dextrameren spezifisch für das GP₃₃₋₄₁ bzw. das NP₃₉₆₋₄₀₄-Epitop und anschließend mit anti-CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A & B) Repräsentative Konturdiagramme von H-2D^b/GP₃₃₋₄₁ Dextramer⁺ bzw. H-2D^b/NP₃₉₆₋₄₀₄ Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der eingegrenzten Population an. (C & D) Anzahl der Gesamt-CD8⁺ T-Zellen und der H-2D^b/GP₃₃₋₄₁ bzw. der H-2D^b/NP₃₉₆₋₄₀₄ Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen von WT und *Irif9*^{-/-} Mäusen. Angegeben ist der Mittelwert und der Standardfehler, n=5. Die P-Werte wurden mit Hilfe des *Student's t* Test ermittelt, ** entspricht P < 0,01, *** entspricht P < 0,001. Die Experimente wurden zweimal mit konsistenten Ergebnissen durchgeführt.

WT und *Irif9*^{-/-} Mäusen generieren geringe Mengen an GP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (A, links). Für NP₃₉₆₋₄₀₄ CD8⁺ T-Zellen ist beschrieben, dass sie stärkere phänotypische und funktionelle Anzeichen der Erschöpfung aufweisen (Blackburn et al., 2009; Utzschneider et al., 2013; Wherry, 2011; Wherry et al., 2003b, 2007). In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen und den zuvor generierten Ergebnissen, weisen *Irif9*^{-/-} Mäuse im Vergleich zum WT nur marginale Frequenzen an NP₃₉₆₋₄₀₄-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf (A, rechts). Die statistische Analyse zeigt keine Unterschiede in der Anzahl der GP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, während die NP₃₉₆₋₄₀₄⁺ CD8⁺ T-Zellen in *Irif9*^{-/-} im Vergleich zum WT stark reduziert sind (B).

Um im nächsten Schritt die Funktion der GP₃₃₋₄₁-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus *Irif9*^{-/-} Mäusen zu analysieren, wurden Milzzellen isoliert und für 5 h mit GP₃₃₋₄₁ und BrefeldinA restimuliert (GP₃₃₋₄₁). Als Kontrolle erfolgte die Restimulation nur mit BrefeldinA (n.s.). Anschließend wurden die CD8⁺ T-Zellen auf die Produktion von IFN γ , TNF α und IL-2 via FACS untersucht und statistisch ausgewertet (Abb. 4.26). Anna Guralnik unterstützte die Experimente bei der Restimulation, Färbung und durchflusszytometrischen Messung.

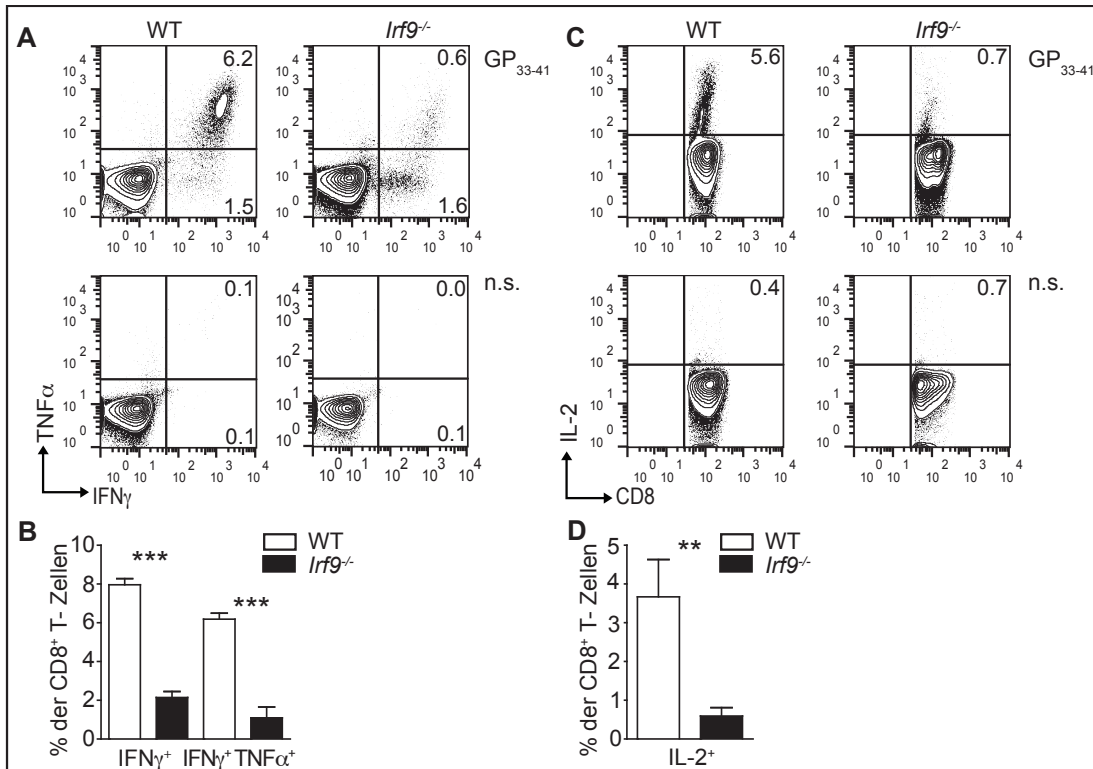


Abb. 4.26 Zytokinproduktion der WT und *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen 30 Tage p.i. . WT und *Irf9*^{-/-} Mäuse wurden mit 1000 PFU LCMV Arm i.p. infiziert und 30 Tage später wurden Milzzellen isoliert und mit GP₃₃₋₄₁ und BrefeldinA bzw. ohne GP₃₃₋₄₁ (n.s.) für 5 h restimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung mit anti-CD8, gefolgt von der intrazellulären Färbung mit anti-IFN γ und anti-TNF α bzw. IL-2. Die FACS-Abbildung zeigt ein repräsentatives Konturdiagramm der IFN γ - und TNF α -Produktion (A) bzw. der IL-2-Produktion (B) der CD8⁺ T-Zellen. Jeweils obere Reihe mit GP₃₃₋₄₁-Restimulation, untere Reihe nicht stimulierte (n.s.) Zellen. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation an. Die Graphen geben den Mittelwert und Standardfehler der Prozente der positiven Zellen von 5 Mäusen/Gruppe an. Die Experimente wurden zweimal wiederholt und bestätigt.

An Tag 30 p.i. ist nur ein Zehntel der *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen positiv für IFN γ /TNF α im Vergleich zu den antigenspezifischen WT CD8⁺ T-Zellen. Auch die IL-2-Produktion ist in *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen um ein achtfaches reduziert. Diese funktionellen Defekte zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit von IRF9 30 Tage nach einer LCMV Arm-Infektion weiterhin Merkmale der Erschöpfung aufrecht halten, so wie es für chronische Infektionen typisch ist. Aufgrund einer anhaltenden Aktivierung kommt es bei chronischen Infektionen zur Erschöpfung von CD8⁺ T-Zellen (Doering et al., 2012). Diese Daten weisen somit darauf hin, dass IRF9 an der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen beteiligt sein könnte.

Im nächsten Schritt wurde die Expression von PD-1 und LAG-3 *ex vivo* auf GP₃₃₋₄₁-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus *Irf9*^{-/-} Mäusen durchflusszytometrisch analysiert und statistisch ausgewertet (Abb. 4.27). Anna Guralnik unterstützte diese Experimente bei der Färbung und der durchflusszytometrischen Messung.

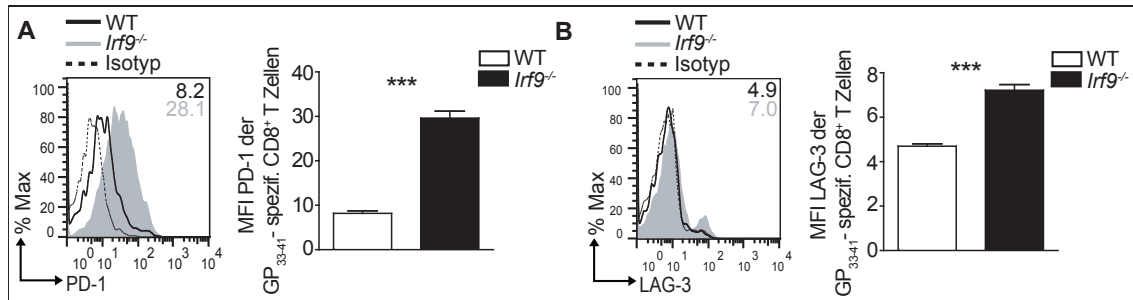


Abb. 4. 27 Analyse von inhibitorischen Rezeptoren auf antigenspezifischen WT und *Irif9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. (A & B) 30 Tage p.i. wurden Milzzellen der WT und *Irif9*^{-/-} Mäusen isoliert und *ex vivo* mit dem MHC-I Dextramer H-2D^b/GP₃₃₋₄₁, mit anti-CD8 und anti-PD-1 bzw. anti-LAG-3 gefärbt und via FACS analysiert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme. Die Zahlenwerte geben die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von PD-1 (A) und LAG-3 (B) der H-2D^b/GP₃₃₋₄₁-Dextramer⁺ CD8⁺ T-Zellen an. Die graphische Darstellung gibt den Mittelwert und den Standardfehler der MFI an, n=5. Die P-Werte wurden mit Hilfe des *Student's t* Test ermittelt, *** entspricht P< 0,001. Das Experiment wurde zweimal mit 5 Mäusen/Gruppe mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

In Übereinstimmung mit den zuvor generierten Daten exprimieren *Irif9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen an Tag 30 p.i. signifikant mehr PD-1 und LAG-3 auf ihrer Oberfläche im Vergleich zum WT.

Es ist beschrieben, dass die Blockade der Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade bei LCMV Klon 13-Infektionen zu erhöhten Level an DCs mit einem immunstimulatorischen Phänotyp führt (Teijaro et al., 2013). Es ist somit möglich, dass CD8⁺ T-Zellen in *Irif9*^{-/-} Mäusen während einer LCMV Arm-Infektion über einen verlängerten Zeitraum sehr stark aktiviert werden, woraufhin sie im Verlauf der Infektion typische Charakteristika der Erschöpfung aufweisen, wie es für chronische Infektionen bekannt ist. Dies weist daraufhin, dass IRF9 anscheinend essentiell für eine reguläre Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade ist und die Generierung einer funktionellen CD8⁺ T-Zellantwort im Zuge einer akuten LCMV-Infektion extrinsisch beeinflusst.

5 Diskussion

CD8⁺ T-Zellen benötigen die Transkriptionsfaktoren IRF4 und IRF9 für eine protektive Immunreaktion gegen intrazelluläre Pathogene

Es ist bekannt, dass *Irf4*^{-/-} Mäuse während einer LCMV-Infektion bedeutende Defekte in der humoralen und zellulären Immunität aufweisen (Mittrücker et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Differenzierung von CD8⁺ Effektor T-Zellen durch IRF4 zellintrinsisch reguliert wird. Um eine starke CD8⁺ Effektor T-Zellantwort zu induzieren, die für die Eradikation von intrazellulären Bakterien obligat ist (Pamer, 2004), wurden WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse mit Listerien infiziert.

Bei der Untersuchung der bakteriellen Titer konnte beobachtet werden, dass *Irf4*^{-/-} Mäuse im Verlauf der Infektion eine erhöhte Listerienlast aufwiesen und die Listerien teilweise nicht eliminieren konnten. Zusätzlich generierten *Irf4*^{-/-} Mäuse eine deutlich reduzierte Anzahl an listerienspezifischen CD8⁺ T-Zellen in Milz, Leber und KM.

Im Zuge einer Infektion mit intrazellulären Pathogenen proliferieren CD8⁺ Effektor T-Zellen sehr stark und weisen einen CD44^{hi}KLRG1^{hi}CD62L^{lo}IL7Rα^{lo}-Phänotyp auf. Weiterhin sind sie durch die erhöhte Produktion der Zytokine IFNγ, TNFα und zytotoxischen Moleküle wie GranzymB charakterisiert (Cui and Kaech, 2010). Die GranzymB-Expression ermöglicht die direkte Eliminierung von infizierten Zellen, während IFNγ die indirekte Aktivierung der antiviralen und bakteriellen Immunantwort ermöglicht. Bei der Untersuchung des Phänotyps und der Funktion zeigte sich, dass es in Abwesenheit von IRF4 zu generellen Defekten in der Ausbildung einer CD8⁺ Effektor T-Zellantwort im Verlauf einer Listerieninfektion kommt. CD8⁺ T-Zellen aus *Irf4*^{-/-} Mäusen regulierten CD62L kaum herunter und wiesen eine stark verminderte KLRG1-Expression auf. Ein genereller Aktivierungsdefekt konnte jedoch ausgeschlossen werden, da sie eine zum WT prozentual vergleichbare Expression des Aktivierungsmarkers CD44 aufwiesen. Zusätzlich zum veränderten Phänotyp produzierten *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nur sehr geringe Mengen an IFNγ, TNFα und IL-2. Studien zu einer Infektion mit Influenza haben gezeigt, dass IRF4 als entscheidender

Faktor die Effektorzelldifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen kontrolliert, indem es die Expression von *Ifng* und *Gzmb* aktiv aufrecht erhält (Yao et al., 2013). Untersuchungen anderer Gruppen weisen daraufhin, dass IRF4 die Effektorzelldifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen wahrscheinlich nicht extrinsisch durch eine defekte Entwicklung von APCs beeinflusst (De Silva et al., 2012; Tussiwand et al., 2012).

Rekonstitutionsexperimente gaben einen Hinweis darauf, dass IRF4 eine intrinsische Funktion für die Differenzierung von CD8⁺ Effektor T-Zellen während einer Listerieninfektion hat. In einer IRF4-defizienten Umgebung wurden funktionelle WT CD8⁺ Effektor T-Zellen generiert. Dass IRF4 die Funktion von CD8⁺ Effektorzellen intrinsisch reguliert, wurde durch den Transfer von *Irf4*^{-/-} OT-I CD8⁺ T-Zellen in kongene WT Mäuse mit nachfolgender *Lm Ova*-Infektion bestätigt.

Die Expansion von CD8⁺ T-Zellen wird durch Zellproliferation und Zelltod reguliert (Ream et al., 2010). In dieser Arbeit wurden deutliche Defekte bei der Akkumulation von *Irf4*^{-/-} CD8⁺ Zellen beobachtet. Studien anderer Gruppen zeigten, dass IRF4 für die kontinuierliche Expansion der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen von großer Bedeutung ist (Man et al., 2013; Yao et al., 2013). Das Überleben von CD8⁺ Effektor T-Zellen wird u.a. durch die balancierte Expression des antiapoptotischen Markers BCL2 und des proapoptotischen Markers BIM kontrolliert (Kurtulus et al., 2011). Aus Ergebnissen einer Studie geht hervor, dass IRF4 direkt in diesen Prozess involviert ist, indem es durch die Repression von BIM und Inhibitoren der Zellzyklusproteine *cycline dependent kinases* (CDKs) das Überleben und die Expansion der CD8⁺ T-Zellen fördert (Yao et al., 2013). Eine andere Studie geht davon aus, dass nicht dysregulierte BIM- und BCL2-Signalwege die Hauptursache des geringen Überlebens der *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen sind, sondern die Stärke der TZR-Affinität (Man et al., 2013). Eine schwache MHC-I-Peptid-TZR-Interaktion ist ausreichend für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, für die Aufrechterhaltung der Expansion wird jedoch eine starke TZR-Bindung benötigt (Zehn et al., 2009). Dabei ist die IRF4-Expression in CD8⁺ T-Zellen abhängig von der Stärke des TZR-Signals. Es ist beschrieben, dass ein schwaches TZR-Signal zu einer geringen IRF4-Expression und vermehrt zu Apoptose führt, während ein starkes TZR-Signal die IRF4-Expression und somit die Expansion der CD8⁺ T-Zellen fördert (Man et al., 2013; Yao et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die IRF4-Expression in CD8⁺ T-Zellen *in vitro* und *in vivo* durch TZR-Stimulation sehr schnell induziert werden kann. *In vitro* war die Expressionsstärke von IRF4 abhängig von der anti-CD3-Konzentration. Das Maximum der IRF4-Expression *in vivo* an Tag 6 p.i. korrelierte dabei mit der Ausbildung des Effektorphänotyps. Somit ist IRF4 anscheinend ein grundlegender TF in CD8⁺ T-Zellen und essentiell für deren Effektorzelldifferenzierung. Die beobachteten Befunde korrelieren zudem mit den Erkenntnissen, dass die IRF4-Expression abhängig von der Affinität der Antigen-TZR-Interaktion ist. CD8⁺ T-Zellen mit einer geringen Antigenpezifität exprimieren wenig IRF4 und zeigen ebenso wie *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen eine stark verminderte antigenspezifische Immunantwort und Beeinträchtigungen in der Effektorzelldifferenzierung (Man et al., 2013).

Die *in vivo* Untersuchungen zeigten zusätzlich zur veränderten Expression der Aktivierungsmarker, dass IRF4 unerlässlich für die Produktion von Effektormolekülen und für die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ Effektorzellen ist. In der Masterarbeit von Lena Höcker in der AG Huber konnte gezeigt werden, dass die ektopische Überexpression von IRF4 in *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen, die Produktion der Effektorzytokine IFN γ und TNF α ermöglicht, wodurch der Differenzierungsdefekt zumindest teilweise wieder aufgehoben wurde. Funktionelle Defekte von *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen sind demnach nicht auf eine fehlerhafte Reifung der T-Zellen im Thymus zurückzuführen. Diese Befunde sind konsistent mit anderen Studien, die zeigen, dass *Irf4*^{-/-} Mäuse eine normale CD8⁺ T-Zellentwicklung im Thymus aufweisen, die sich nicht von WT CD8⁺ T-Zellen unterscheidet (Man et al., 2013; Mittrücker et al., 1997; Nayar et al., 2012).

Die Effektorzelldifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen ist durch die koordinierte und dynamische Expression von spezifischen TF kontrolliert. Die TF TBX21, BLIMP1 und ID2 werden verstärkt in CD8⁺ Effektor T-Zellen exprimiert (Kaech and Cui, 2012). In Übereinstimmung mit den zuvor generierten Daten zeigten *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen *in vivo* eine verminderte mRNA-Expression dieser TF. Weiterhin konnte publiziert werden, dass IRF4 für die Funktion von TBX21 benötigt wird (Yao et al., 2013). Die TF EOMES, BCL6 und ID3 werden überwiegend in CD8⁺ Gedächtniszellen exprimiert (Kaech and Cui, 2012). In Abwesenheit von IRF4 exprimierten CD8⁺ T-Zellen erhöhte mRNA-Level dieser Faktoren. Es ist bekannt, dass *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen zwar eine erhöhte EOMES-Expression aufweisen (Huber et al., 2013; Nayar et al., 2012), eine

direkte Repression von EOMES durch die Promotorbindung von IRF4 konnte jedoch bislang nicht nachgewiesen werden (Man et al., 2013). In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten weisen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse daraufhin, dass IRF4 direkt und indirekt die Expression von TF, die in die Effektor- und Gedächtniszelldifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen involviert sind, reguliert.

Die beobachtete verminderte mRNA-Expression von *Id2* in *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen korreliert mit publizierten Daten, die zeigen, dass ID2 die Expansion in CD8⁺ T-Zellen positiv reguliert. *Id2*^{-/-} naive CD8⁺ T-Zellen erkennen ihr Antigen und weisen kurz nach der Infektion ein normales Proliferationsverhalten auf, ähnlich wie *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Im weiteren Verlauf der Infektion akkumulieren *Id2*^{-/-} Zellen aufgrund einer erhöhten Apoptoserate jedoch nicht (Cannarile et al., 2006). Es ist somit denkbar, dass IRF4 die Expansion von CD8⁺ T-Zellen auch in Abhängigkeit von ID2 reguliert.

Die während der akuten Listeriose generierten Daten von *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen, zeigen eine starke Ähnlichkeit zu Daten von *Prdm1*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. In Abwesenheit von BLIMP1 können CD8⁺ T-Zellen eine Influenzainfektion nicht bekämpfen, nicht zu *SLECs* differenzieren und haben eine verminderte zytotoxische Aktivität. Des Weiteren reguliert BLIMP1, wie anscheinend auch IRF4, das transkriptionelle Programm von CD8⁺ Effektor T-Zellen (Kallies et al., 2009). *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen zeigten stark reduzierte *Prdm1* mRNA-Level und es ist bekannt, dass IL-21 in B- und CD4⁺ T-Zellen sowie Tregs die BLIMP1-Expression induziert (Cretney et al., 2011; Kwon et al., 2009; Ozaki et al., 2004). In WT CD8⁺ T-Zellen konnte die Stimulation mit IL-21 die BLIMP1-Expression IRF4-abhängig verstärken. In *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen war keine BLIMP1-Expression nachweisbar. Defekte im STAT3-abhängigen Signalweg von IL-21 können dabei in *Irf4*^{-/-} T-Zellen ausgeschlossen werden (Huber et al., 2008). In B- und CD4⁺ T-Zellen sowie Tregs induzieren STAT3 und IRF4 die BLIMP1-Expression durch Bindung an ein IL-21 responsives Element 3' vom *Prdm1*-Promoter (Cretney et al., 2011; Kwon et al., 2009). Auch in CD8⁺ T-Zellen wird die Expression von BLIMP1 durch die direkte Bindung von IRF4 an das IL-21 responsive Element in *Prdm1* reguliert. BLIMP1 fördert die Ausbildung von zytotoxischen Effektorzellen und ist an der transkriptionellen Regulation von CD8⁺ Effektor T-Zellen beteiligt (Kallies et al., 2009; Shin et al., 2009). Die Effektorzelldifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen wird somit wahrscheinlich durch eine IRF4-abhängige BLIMP1-Expression gefördert.

Der TF BATF reguliert die Differenzierung und Funktion von T- und B-Zellen. In CD4⁺ T-Zellen kontrolliert IRF4 die Differenzierung zu Th17-Zellen durch eine kooperative Bindung mit BATF-JUN-Heterodimeren an AP-1-IRF *composite elements* (AICE) der DNA (Ciofani et al., 2012; Glasmacher et al., 2012). In Tfh-Zellen reguliert BATF die Expression der TF BCL6 und c-MAF (Betz et al., 2010) und wird in B-Zellen für den Isotypenwechsel und die Regulation der Hypermutation benötigt (Ise et al., 2011). Es wurde nun publiziert, dass IRF4 und BATF auch in CD8⁺ T-Zellen kooperieren und deren Effektorfunktionen regulieren (Grusdat et al., 2014; Kurachi et al., 2014). BATF wirkt als Aktivator bei der Expression von Effektorzell-assoziierten TF wie TBX21, BLIMP1 und RUNX3. Zum anderen wirkt BATF als Repressor bei der Expression der Effektormoleküle IFN γ , Perforin und GranzymB (Kurachi et al., 2014). Die Effektorzelldifferenzierung von CD8⁺ T-Zellen ist BATF-abhängig und eine BATF-Defizienz führt zu erhöhten Beeinträchtigungen im zellulären Metabolismus, bei der Proliferation und bei Überlebenssignalwegen (Grusdat et al., 2014; Kurachi et al., 2014). Es ist denkbar, dass BATF durch seine duale Funktion als Regulator für die CD8⁺ Effektor T-Zellantwort wirkt. Auch in CD8⁺ T-Zellen binden BATF und IRF4 kooperativ an DNA-Regionen, die eine Anreicherung der AICE-Motive aufweisen. Während der Effektorzelldifferenzierung werden nur die Gene effektiv reguliert, an die beide TF binden (Kurachi et al., 2014).

Die essentielle Rolle von IRF4 bei der CD8⁺ Effektor T-Zelldifferenzierung wird weiterhin dadurch unterstrichen, dass IRF4 die Glykolyse und den Metabolismus über den HIF-Komplex in CD8⁺ T-Zellen kontrolliert (Man et al., 2013). Dabei ist IRF4 zum einen von großer Bedeutung für die Expression von HIF1 α und FOXO1, die essentiell für den Metabolismus in T-Zellen sind (Finlay et al., 2012; Kerdiles et al., 2009; Rao et al., 2012). Zum anderen reguliert IRF4 z.B. die Expression von Glukosetransportern (Man et al., 2013). Somit ist IRF4 daran beteiligt die benötigte Energie für das Wachstum und die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen bereit zu stellen.

Irf4^{-/-} CD8⁺ T-Zellen zeigten während der Effektorphase phänotypische Merkmale von Gedächtniszellen (CD44^{hi}, IL7R α ^{hi} und KLRG1^{lo}) und wiesen erhöhte Expressionslevel der mit der Gedächtniszelldifferenzierung assoziierten TF BCL6, EOMES und ID3 auf. Um den Einfluss von IRF4 auf die Gedächtniszelldifferenzierung zu untersuchen, wurden WT und *Irf4*^{-/-} Mäuse 40 Tage nach der Listerieninfektion analysiert. In

Abwesenheit von IRF4 konnte nur eine sehr geringe Anzahl antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden und gleichzeitig war die Zytokinproduktion kaum detektierbar. Somit ist auch die Generierung einer funktionellen CD8⁺ Gedächtniszellantwort während einer Listerieninfektion IRF4-abhängig. Es ist möglich, dass die Defekte in der Bildung von CD8⁺ Gedächtniszellen auf die fehlende Expansionsphase bei *Irf4*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen sind. So werden wahrscheinlich nur wenige CD8⁺ T-Zellen generiert, die zu langlebigen potenten Gedächtniszellen differenzieren können.

Zusammenfassend konnte im ersten Teil dieser Arbeit demonstriert werden, dass IRF4 als zentraler Regulator für funktionelle CD8⁺ T-Zellen fungiert. Die Kontrolle der Effektorzelldifferenzierung durch IRF4 erfolgt durch die direkte oder indirekte Induktion von Effektorzytokinen, zytotoxischen Molekülen und TF, die in den Differenzierungsprozess von CD8⁺ T-Zellen involviert sind. Dabei ist die Regulation von BLIMP1 durch IRF4 von besonderer Bedeutung für das Verständnis der CD8⁺ Effektorzellentwicklung. IRF4 ist essentiell für die kontinuierliche Proliferation und das Überleben von CD8⁺ Effektor T-Zellen und somit auch von großer Bedeutung für den Prozess der Gedächtniszellgenerierung.

Die hier präsentierten Daten über die Rolle von IRF4 während der CD8⁺ T-Zellantwort und Daten anderer Studien (Huber and Lohoff, 2014), heben zusammen mit Publikationen über die bedeutende Rolle von IRF4 für die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen (Huber and Lohoff, 2014; Murphy et al., 2013; De Silva et al., 2012), die fundamentale Funktion von IRF4 bei der humoralen und zellulären Immunität gegen Infektionen hervor.

Typ I IFN sind Schlüsselregulatoren der angeborenen und adaptiven Immunität (Pestka et al., 2004; Sen and Ransohoff, 1993), die in Antwort auf virale Infektionen sezerniert werden (Ivashkiv and Donlin, 2014). pDCs sind die Hauptproduzenten von Typ I IFN (Levy et al., 2011) und deren autokrine Wirkweise ist entscheidend für ihre robuste Sezernierung als Antwort auf virale Infektionen (Park et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass man bei LCMV Klon 13-Infektionen, im Gegensatz zu LCMV Arm-Infektionen schon einige Stunden p.i. erhöhte IFN β -Level in pDCs findet, einhergehend mit erhöhten Expressionslevel von proinflammatorischen Zytokinen und

Chemokinen, wodurch ein immunstimulatorisches Milieu geschaffen wird (Teijaro et al., 2013; Wilson et al., 2013). Zu späteren Zeitpunkten p.i. (5-9 Tage p.i.) wirkt bei LCMV Klon 13-Infektionen die Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade immunsupprimierend (Teijaro et al., 2013). Typ I IFN können während einer LCMV-Infektion auch direkt die T-Zellantwort beeinflussen und die Unfähigkeit direkt auf Typ I IFN zu reagieren, führt zu einer verminderten Expansion und veränderten Differenzierung von antiviralen CD8⁺ T-Zellen (Aichele et al., 2006; Kolumam et al., 2005; Müller et al., 1994).

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass der TF IRF9 die Erschöpfung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen während einer akuten LCMV-Infektion verhindert. Für die Induktion einer robusten antiviralen CD8⁺ T-Zellantwort, wurden WT und *Irf9*^{-/-} Mäuse mit LCMV Arm infiziert, das u. a. aus dem Glyko- und Nukleoprotein (GP und NP) besteht (Riviere et al., 1985). GP vermittelt die Interaktion zwischen Virus und Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen (Borrow and Oldstone, 1994; Cao et al., 1998), während NP mit der viralen RNA assoziiert, um das Nukleokapsid aufzubauen, das die Vorlage für die virale RNA Polymerase darstellt (Fuller-Pace and Southern, 1988). Bei der Untersuchung der Zellfrequenz 8 Tage p.i. zeigten *Irf9*^{-/-} Mäuse sichtbare Defekte in der Akkumulation der GP₃₃₋₄₁- und NP₃₉₆₋₄₀₄-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. *Irf9*^{-/-} GP₃₃₋₄₁ spezifische CD8⁺ T-Zellen wiesen auch eine stark verminderte Expression des Aktivierungsmarkers KLGR1 auf und waren kaum in der Lage die Effektormoleküle IFN γ , TNF α und IL-2 sowie die zytotoxischen Moleküle GranzymB, GranzymK und Perforin in Antwort auf die LCMV Arm-Infektion zu produzieren. Zusätzlich zu den funktionellen Defekten regulierten die CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit von IRF9 die Expression der inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und LAG-3 verstärkt hoch.

Bei einer IRF9-Defizienz kommt es wahrscheinlich zu Beeinträchtigungen in der Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade und es ist beschrieben, dass T-Zellen, die nicht direkt auf Typ I IFN reagieren können, eine verminderte Expansion zeigen, die dadurch bedingt ist, dass sie während der frühen Phase der LCMV-Infektion direkt durch NK-Zellen eliminiert werden (Crouse et al., 2014; Xu et al., 2014). Bei chronischen Infektionen wird durch Defekte im IFNAR-Signaltransduktionsweg die Menge der CD8⁺ T-Zellen beeinflusst, indem NK-Zellen CD4⁺ T-Zellen eliminieren, was

konsequenterweise in einer reduzierten Anzahl an CD8⁺ T-Zellen resultiert (Waggoner et al., 2014). Somit ist es denkbar, dass IRF9 über die Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade daran beteiligt ist, CD8⁺ T-Zellen vor der NK-Zelllyse während einer LCMV-Infektion zu schützen.

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass *Irf9*^{-/-} Mäuse im Verlauf einer akuten LCMV Arm-Infektion phänotypische und funktionelle Merkmale von chronischen Infektionen entwickelten, wie sie für LCMV Klon 13-Infektionen typisch sind, bei denen die T-Zellerschöpfung hierarchisch erfolgt (Cousens et al., 1999; Müller et al., 1994; Ou et al., 2001; Wherry, 2011). Die Erschöpfung von CD8⁺ T-Zellen geht mit einer veränderten Expression von TF und weiteren Genen einher, die in die transkriptionelle Regulation involviert sind (Doering et al., 2012; Kao et al., 2011; Wherry, 2011). Des Weiteren wird die T-Zellerschöpfung u.a. durch die Expression von inhibitorischen Oberflächenrezeptoren wie PD-1 und LAG-3 reguliert (Wherry, 2011). PD-1 ist als negativer Regulator der peripheren T-Zellantwort von großer Bedeutung, da es die TZR-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion, die für die Proliferation und Zytokinproduktion benötigt wird, inhibiert (Nguyen and Ohashi, 2015; Okazaki et al., 2013; Terawaki et al., 2011).

Der TF TBX21 zeigt während der T-Zellerschöpfung eine fundamental andere Funktion als während der akuten Infektion, wo er die Bildung von hoch funktionellen Effektorzellen fördert (Kao et al., 2011). Die in der vorgelegten Arbeit beobachtete Herunterregulierung von TBX21 bei gleichzeitig erhöhter Expression von PD-1 und LAG-3 in *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen ist konsistent mit Befunden von CD8⁺ T-Zellen während chronischer Infektionen, bei denen die TBX21-Expression invers mit der PD-1-Expression korreliert. Es wird angenommen, dass TBX21 die CD8⁺ T-Zellerschöpfung dadurch reguliert, dass es die Expression von LAG-3 und besonders von PD-1 durch die Bindung des Promoters im PD-1-Gen (*Pdcd1*) unterdrückt (Kao et al., 2011).

Die in dieser Arbeit beobachteten Defekte in CD8⁺ T-Zellen aus *Irf9*^{-/-} Mäusen sind möglicherweise extrinsisch bedingt. Um LCMV-Infektionen bekämpfen und klären zu können, erhalten CD8⁺ T-Zellen obligatorische Hilfe von IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen (Schiavoni et al., 2013). Die optimale Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen wird

dadurch erleichtert, dass Typ I IFN die DC-Aktivierung verstärken (Schiavoni et al., 2013) und die Produktion von IFN γ induzieren (Nguyen et al., 2002). Weiterhin ist bekannt, dass die IFN γ -Signaltransduktion die TBX21-Expression während der CD4⁺ Th1-Differenzierung verstärken kann (Afkarian et al., 2002). Typ I IFN können die TBX21-Expression auch direkt regulieren (Hibbert et al., 2003) und so die Effektorfunktionen von CD4⁺ T-Zellen gewährleisten. Naive CD8⁺ T-Zellen können direkt von pDCs aktiviert werden, indem Typ I IFN die Hochregulierung von MHC-I Molekülen auf pDCs und die Expression von kostimulatorischen Molekülen für T-Zellen induzieren (Alsharifi et al., 2008). Dabei wirkt bei einer Infektion besonders die zu einem sehr frühen Zeitpunkt induzierte Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade immunstimulatorisch (Teijaro et al., 2013; Wilson et al., 2013). Die autokrine Wirkweise von Typ I IFN vermittelt sowohl deren basale Sezernierung als auch die robuste IRF7-abhängige Produktion von spätem Typ I IFN, die essentiell für die effektive antivirale Immunantwort sind (Park et al., 2000). So kontrollieren pDCs die T-Zellantwort und Viruseliminierung durch CD8⁺ T-Zellen (Cervantes-Barragan et al., 2012). Es ist möglich, dass IRF9 die Funktion von pDCs beeinflusst, wodurch es zu Veränderungen in der Typ I IFN-Produktion und der direkten Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch DCs kommt. Bei chronischen LCMV-Infektionen kann sich die Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade negativ auf die Kontrolle der Infektion auswirken. Eine anhaltende Typ I IFN-Exposition durch DCs führt dann zu einer eingeschränkten T-Zellantwort, da es aufgrund der kontinuierlichen TZR-Aktivierung und der daraus resultierenden dauerhaften immunologischen Aktivierung zur Erschöpfung von CD8⁺ T-Zellen kommt (Crouse et al., 2015) und konventionelle Gedächtniszellen nicht gebildet werden können (Wherry et al., 2007). Erschöpfte CD8⁺ T-Zellen unterscheiden sich in ihrem transkriptionellen Profil fundamental von konventionellen CD8⁺ Gedächtniszellen, da ihnen ein Genmodul fehlt, das mit einem Ruhezustand assoziiert wird (Doering et al., 2012). Dies ist dadurch bedingt, dass der Zustand der Erschöpfung mit einem anhaltenden Aktivierungsprogramm assoziiert wird, das sich von dem Effektorprogramm unterscheidet (Doering et al., 2012). Der Zustand der Erschöpfung kann somit als eigener Differenzierungszustand charakterisiert werden (Utzschneider et al., 2013).

NP₃₉₆₋₄₀₄-spezifische CD8⁺ T-Zellen sind während chronischer Infektionen kaum detektierbar (Zajac et al., 1998; Zhou et al., 2002), während GP₃₃₋₄₁-spezifische CD8⁺ T-Zellen im Verlauf chronischer Infektionen detektierbar bleiben, aber die Fähigkeit verlieren IFN γ zu produzieren und als funktionell erschöpft bezeichnet werden (Utzschneider et al., 2013; Wherry et al., 2003a; Zajac et al., 1998). Virusinfizierte Zellen präsentieren T-Zellen sowohl GP₃₃₋₄₁- als auch NP₃₉₆₋₄₀₄-Epitope. Es ist möglich, dass unterschiedliche Mengen dieser Epitope in chronisch infizierten Mäusen vorhanden sind, weshalb GP₃₃₋₄₁- und NP₃₉₆₋₄₀₄-spezifische CD8⁺ T-Zellen nicht gleichwertig aktiviert werden (Zhou et al., 2002). Eine andere Studie konnte zeigen, dass bei chronischen Infektionen erhöhte Level der NP₃₉₆₋₄₀₄-Epitope im Gegensatz zu GP₃₃₋₄₁-Epitopen präsentiert werden. Diese erhöhte Präsentation der NP₃₉₆₋₄₀₄-Epitope führt dazu, dass vermehrt NP₃₉₆₋₄₀₄-spezifische CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden und danach in Apoptose gehen, während GP₃₃₋₄₁-spezifische CD8⁺ T-Zellen auf einem geringerem Level stimuliert werden, was zu funktionellen Einschränkungen führen kann (Wherry et al., 2003a). Somit können antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen bei chronischen Infektionen in verschiedene Klassen unterteilt werden, wobei der Zustand von voll funktionell, teilweise erschöpft und vollständig erschöpft abhängig von den viralen Epitopen, der Antigenlast und der Dauer der Infektion ist (Wherry et al., 2003a). Damit übereinstimmend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass 30 Tage nach einer LCMV Arm-Infektion keine Frequenzunterscheide zwischen GP₃₃₋₄₁-spezifischen *Irf9*^{-/-} und WT CD8⁺ T-Zellen detektierbar sind. Die GP₃₃₋₄₁-spezifischen *Irf9*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen zeigten nach der Antigenstimulation enorme Defekte in der Zytokinproduktion und wiesen weiterhin eine erhöhte Expression von PD-1 und LAG-3 auf. Diese Daten deuten auf die wichtige Rolle von IRF9 beim Schutz der CD8⁺ T-Zellen vor Erschöpfung hin.

Es ist bekannt, dass die Sezernierung von späten Typ I IFN die DC-Differenzierung durch Bindung an ihren Rezeptor inhibiert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bei LCMV Arm-Infektionen nur bis ca. 5 Tage p.i. Typ I IFN in DCs synthetisiert werden, während bei LCMV Klon 13-Infektionen zum einen sehr viel mehr Typ I IFN zu diesem Zeitpunkt in DCs synthetisiert werden und die Synthese kontinuierlich bis zu 50 Tage p.i. erfolgt. Während dieser Periode kommt es zu einer generalisierten Immunsuppression (Hahm et al., 2005). Dabei wird bei

LCMV Klon 13-Infektionen die Frequenz der DC-Vorläufer reduziert, wodurch es zu einer STAT2-abhängigen aber STAT1-unabhängigen Reduktion der DC-Population kommt (Hahm et al., 2005). Weiterhin ist beschrieben, dass DCs CD8⁺ T-Zellen direkt aktivieren können (Crouse et al., 2015) und eine Blockade der Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade bei LCMV Klon 13-Infektionen zu DCs mit einem immunstimulatorischen Phänotyp führt (Teijaro et al., 2013). Von diesen Kenntnissen ausgehend sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein Hinweis darauf, dass neben STAT2 wahrscheinlich auch IRF9 die Typ I IFN-Signaltransduktionskaskade reguliert. Eine IRF9-Defizienz könnte während einer viralen Infektion eine verstärkte Aktivierung der DCs bedingen, was zu einer anhaltenden Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen führt und in der phänotypischen und funktionellen Erschöpfung der Zellen resultiert und die Generierung von CD8⁺ Gedächtniszellen verhindert. Somit würde die Regulation der viralen Immunantwort und auch die Generierung einer effektiven CD8⁺ T-Zellantwort wahrscheinlich in Abhängigkeit von IRF9 und STAT2 erfolgen.

Es gibt Hinweise darauf, dass durch Blockierung der Interaktion von PD-1 mit seinem Liganden PD-1L, entweder allein oder in Kombination mit z.B. LAG-3, erschöpfte CD8⁺ T-Zellen ihre Effektorfunktionen wieder erlangen können (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2009; Fourcade et al., 2012). Dieser Ansatz der Ak-vermittelten Blockade, wird vermehrt bei Krebspatienten eingesetzt und der Einfluss auf chronische Infektionen wird evaluiert (Gubin et al., 2014; Herbst et al., 2014; Powles et al., 2014; Yadav et al., 2014). Die Blockade von immunologischen Kontrollpunkten und damit die Wiederherstellung der T-Zellfunktion spielt eine Schlüsselrolle in der Krebs- und antiviralen Therapie. Wenn es einen Zusammenhang zwischen IRF9 und der T-Zellerschöpfung gäbe, wäre es sehr interessant, die Koexpression von IRF9 und PD-1 während viraler Infektionen und Tumorerkrankungen im Menschen zu untersuchen. Studien, die das Ziel hätten die Expression von IRF9 zu verstärken, könnten therapeutisch eingesetzt werden, um die T-Zellerschöpfung zu verringern und die Immunantwort während Tumorerkrankungen oder chronischen viralen Infektionen zu verstärken.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IRF4 und IRF9 bedeutende Einfluss auf die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort haben. IRF4 ist der zentrale Regulator von

funktionellen CD8⁺ Effektor T-Zellen, während IRF9 CD8⁺ T-Zellen vor der Erschöpfung schützt, indem es wahrscheinlich die Entwicklung von DCs reguliert und die Hochregulation inhibitorischer Rezeptoren verhindert. Somit sind IRF4 und IRF9 entscheidend für zwei Aspekte in der Immunantwort: bei der Immunität gegen Pathogene und bei der Tumorsuppression. Durch weitere Studien könnten beide Faktoren zu einem attraktiven Target bei der Therapie gegen Infektionskrankheiten und bei der multidisziplinären Krebstherapie werden.

6 Literaturverzeichnis

- Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 3, 549–557.
- Aichele, P., Unsoeld, H., Koschella, M., Schweier, O., Kalinke, U., and Vucikuj, S. (2006). CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 4525–4529.
- Alsharifi, M., Müllbacher, A., and Regner, M. (2008). Interferon type I responses in primary and secondary infections. *Immunol. Cell Biol.* 86, 239–245.
- Andrews, D.M., Estcourt, M.J., Andoniou, C.E., Wikstrom, M.E., Khong, A., Voigt, V., Fleming, P., Tabarias, H., Hill, G.R., van der Most, R.G., et al. (2010). Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J. Exp. Med.* 207, 1333–1343.
- Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2010). Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8⁺ T cells to compete for the memory cell niche. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 4988–4992.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687.
- Begitt, A., Droscher, M., Meyer, T., Schmid, C.D., Baker, M., Antunes, F., Owen, M.R., Naumann, R., Decker, T., and Vinkemeier, U. (2014). STAT1-cooperative DNA binding distinguishes type 1 from type 2 interferon signaling. *Nat. Immunol.* 15, 168–176.
- Betz, B.C., Jordan-Williams, K.L., Wang, C., Kang, S.G., Liao, J., Logan, M.R., Kim, C.H., and Taparowsky, E.J. (2010). Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *J. Exp. Med.* 207, 933–942.
- Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 10, 29–37.
- Bollig, N., Brüstle, A., Kellner, K., Ackermann, W., Abass, E., Raifer, H., Camara, B., Brendel, C., Giel, G., Bothur, E., et al. (2012). Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8664–8669.
- Borrow, P., and Oldstone, M.B. (1994). Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* 198, 1–9.

- Brass, A.L., Kehrl, E., Eisenbeis, C.F., Storb, U., and Singh, H. (1996). Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes Dev.* *10*, 2335–2347.
- Brüstle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplänter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T., and Lohoff, M. (2007). The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat. Immunol.* *8*, 958–966.
- Buggert, M., Tauriainen, J., Yamamoto, T., Frederiksen, J., Ivarsson, M.A., Michaëlsson, J., Lund, O., Hejdeman, B., Jansson, M., Sönnernborg, A., et al. (2014). T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8⁺ T cells in HIV infection. *PLoS Pathog.* *10*, e1004251.
- Cannarile, M.A., Lind, N.A., Rivera, R., Sheridan, A.D., Camfield, K.A., Wu, B.B., Cheung, K.P., Ding, Z., and Goldrath, A.W. (2006). Transcriptional regulator Id2 mediates CD8⁺ T cell immunity. *Nat. Immunol.* *7*, 1317–1325.
- Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P., and Oldstone, M.B. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* *282*, 2079–2081.
- Castelli, C., Rivoltini, L., Andreola, G., Carrabba, M., Renkvist, N., and Parmiani, G. (2000). T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J. Cell. Physiol.* *182*, 323–331.
- Cervantes-Barragan, L., Lewis, K.L., Firner, S., Thiel, V., Hugues, S., Reith, W., Ludewig, B., and Reizis, B. (2012). Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3012–3017.
- Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., et al. (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* *315*, 1687–1691.
- Chen, L.-S., Wei, P.-C., Liu, T., Kao, C.-H., Pai, L.-M., and Lee, C.-K. (2009). STAT2 hypomorphic mutant mice display impaired dendritic cell development and antiviral response. *J. Biomed. Sci.* *16*, 22.
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C.N., Muratet, M., et al. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* *151*, 289–303.
- Cossart, P. (2007). Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *9*, 1143–1146.
- Cousens, L.P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J.D., Ahmed, R., and Biron, C.A. (1999). Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated

pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J. Exp. Med.* *189*, 1315–1328.

Cox, M.A., Harrington, L.E., and Zajac, A.J. (2011). Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends Immunol.* *32*, 180–186.

Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., et al. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *12*, 304–311.

Crotty, S., Johnston, R.J., and Schoenberger, S.P. (2010). Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat. Immunol.* *11*, 114–120.

Crouse, J., Bedenikovic, G., Wiesel, M., Ibberson, M., Xenarios, I., Von Laer, D., Kalinke, U., Vivier, E., Jonjic, S., and Oxenius, A. (2014). Type I interferons protect T cells against NK cell attack mediated by the activating receptor NCR1. *Immunity* *40*, 961–973.

Crouse, J., Kalinke, U., and Oxenius, A. (2015). Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 231–242.

Cui, W., and Kaech, S.M. (2010). Generation of effector CD8⁺ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol. Rev.* *236*, 151–166.

Cui, W., Liu, Y., Weinstein, J.S., Craft, J., and Kaech, S.M. (2011). An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8⁺ T cells. *Immunity* *35*, 792–805.

Darnell, J.E., Jr, Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* *264*, 1415–1421.

Doering, T.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Paley, M.A., Ziegler, C.G., and Wherry, E.J. (2012). Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8⁺ T cell exhaustion versus memory. *Immunity* *37*, 1130–1144.

Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M., and Chakraborty, T. (1992). A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* *11*, 1981–1990.

Durbin, J.E., Fernandez-Sesma, A., Lee, C.K., Rao, T.D., Frey, A.B., Moran, T.M., Vukmanovic, S., García-Sastre, A., and Levy, D.E. (2000). Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 4220–4228.

Fazakerley, J.K., Southern, P., Bloom, F., and Buchmeier, M.J. (1991). High resolution in situ hybridization to determine the cellular distribution of lymphocytic choriomeningitis virus RNA in the tissues of persistently infected mice: relevance to

arenavirus disease and mechanisms of viral persistence. *J. Gen. Virol.* 72 (*Pt 7*), 1611–1625.

Finlay, D.K., Rosenzweig, E., Sinclair, L.V., Feijoo-Carnero, C., Hukelmann, J.L., Rolf, J., Panteleyev, A.A., Okkenhaug, K., and Cantrell, D.A. (2012). PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 209, 2441–2453.

Foulds, K.E., Zenewicz, L.A., Shedlock, D.J., Jiang, J., Troy, A.E., and Shen, H. (2002). Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 1528–1532.

Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Olive, D., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2012). CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* 72, 887–896.

Fujii, Y., Shimizu, T., Kusumoto, M., Kyogoku, Y., Taniguchi, T., and Hakoshima, T. (1999). Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J.* 18, 5028–5041.

Fuller-Pace, F.V., and Southern, P.J. (1988). Temporal analysis of transcription and replication during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 162, 260–263.

Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., et al. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849–852.

Glasmacher, E., Agrawal, S., Chang, A.B., Murphy, T.L., Zeng, W., Vander Lugt, B., Khan, A.A., Ciofani, M., Spooner, C.J., Rutz, S., et al. (2012). A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF complexes. *Science* 338, 975–980.

Grayson, J.M., Weant, A.E., Holbrook, B.C., and Hildeman, D. (2006). Role of Bim in Regulating CD8⁺ T-Cell Responses during Chronic Viral Infection. *J. Virol.* 80, 8627–8638.

Grusdat, M., McIlwain, D.R., Xu, H.C., Pozdeev, V.I., Knievel, J., Crome, S.Q., Robert-Tissot, C., Dress, R.J., Pandya, A.A., Speiser, D.E., et al. (2014). IRF4 and BATF are critical for CD8⁺ T-cell function following infection with LCMV. *Cell Death Differ.* 21, 1050–1060.

Gubin, M.M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J.P., Noguchi, T., Ivanova, Y., Hundal, J., Arthur, C.D., Krebber, W.-J., et al. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515, 577–581.

Gupta, S., Jiang, M., Anthony, A., and Pernis, A.B. (1999). Lineage-specific modulation of interleukin 4 signaling by interferon regulatory factor 4. *J. Exp. Med.* 190, 1837–1848.

- Hahm, B., Trifilo, M.J., Zuniga, E.I., and Oldstone, M.B.A. (2005). Viruses evade the immune system through type I interferon-mediated STAT2-dependent, but STAT1-independent, signaling. *Immunity* 22, 247–257.
- Herbst, R.S., Soria, J.-C., Kowanetz, M., Fine, G.D., Hamid, O., Gordon, M.S., Sosman, J.A., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Gettinger, S.N., et al. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515, 563–567.
- Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal Malefyt, R., and Kastelein, R.A. (2003). IL-27 and IFN- α signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12R β 2 in naive T cells. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 23, 513–522.
- Hof, H., Szabo, K., and Becker, B. (2007). [Epidemiology of listeriosis in Germany: a changing but ignored pattern]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 132, 1343–1348.
- Hofer, M.J., Li, W., Manders, P., Terry, R., Lim, S.L., King, N.J.C., and Campbell, I.L. (2012). Mice deficient in STAT1 but not STAT2 or IRF9 develop a lethal CD4⁺ T-cell-mediated disease following infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 86, 6932–6946.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17–27.
- Huber, M., and Lohoff, M. (2014). IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. *Eur. J. Immunol.* 44, 1886–1895.
- Huber, M., Brüstle, A., Reinhard, K., Guralnik, A., Walter, G., Mahiny, A., von Löw, E., and Lohoff, M. (2008). IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20846–20851.
- Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., et al. (2013). IL-17A secretion by CD8⁺ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* 123, 247–260.
- Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., et al. (2005). Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6, 1236–1244.
- Ise, W., Kohyama, M., Schraml, B.U., Zhang, T., Schwer, B., Basu, U., Alt, F.W., Tang, J., Oltz, E.M., Murphy, T.L., et al. (2011). The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat. Immunol.* 12, 536–543.
- Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 36–49.

- Janeway, C.A., Murphy, K., and Travers, P., Walport, Mark (2008). Janeway's immunobiology.
- Jenkins, M.R., and Griffiths, G.M. (2010). The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 308–313.
- Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27, 281–295.
- Joshi, N.S., Cui, W., Dominguez, C.X., Chen, J.H., Hand, T.W., and Kaech, S.M. (2011). Increased numbers of preexisting memory CD8 T cells and decreased T-bet expression can restrain terminal differentiation of secondary effector and memory CD8 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 4068–4076.
- Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 749–761.
- Kallies, A., Xin, A., Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2009). Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* 31, 283–295.
- Kao, C., Oestreich, K.J., Paley, M.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Ali, M.-A.A., Intlekofer, A.M., Boss, J.M., Reiner, S.L., Weinmann, A.S., et al. (2011). Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. *Nat. Immunol.* 12, 663–671.
- Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat. Immunol.* 10, 176–184.
- Kernbauer, E., Maier, V., Stoiber, D., Strobl, B., Schneckenleithner, C., Sexl, V., Reichart, U., Reizis, B., Kalinke, U., Jamieson, A., et al. (2012). Conditional Stat1 ablation reveals the importance of interferon signaling for immunity to *Listeria monocytogenes* infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002763.
- Khanolkar, A., Fuller, M.J., and Zajac, A.J. (2002). T cell responses to viral infections: lessons from lymphocytic choriomeningitis virus. *Immunol. Res.* 26, 309–321.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 68, 521–531.
- Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J., and Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J. Exp. Med.* 202, 637–650.
- Kurachi, M., Barnitz, R.A., Yosef, N., Odorizzi, P.M., Diiorio, M.A., Lemieux, M.E., Yates, K., Godec, J., Klatt, M.G., Regev, A., et al. (2014). The transcription factor

BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8(+) T cells. *Nat. Immunol.*

Kurtulus, S., Tripathi, P., Moreno-Fernandez, M.E., Sholl, A., Katz, J.D., Grimes, H.L., and Hildeman, D.A. (2011). Bcl-2 allows effector and memory CD8+ T cells to tolerate higher expression of Bim. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5729–5737.

Kwon, H., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Kim, H.-P., Oh, J., Tunyaplin, C., Carotta, S., Donovan, C.E., Goldman, M.L., Tailor, P., et al. (2009). Analysis of interleukin-21-induced *Prdm1* gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity* *31*, 941–952.

Lau, L.L., Jamieson, B.D., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1994). Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* *369*, 648–652.

Legat, A., Speiser, D.E., Pircher, H., Zehn, D., and Furtado Marraco, S.A. (2013). Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than “Exhaustion” of Human CD8 T Cells. *Front. Immunol.* *4*.

Levy, D.E., Marié, I.J., and Durbin, J.E. (2011). Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr. Opin. Virol.* *1*, 476–486.

Li, P., Spolski, R., Liao, W., Wang, L., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Leonard, W.J. (2012). BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature* *490*, 543–546.

Lohoff, M., and Mak, T.W. (2005). Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 125–135.

Lohoff, M., Mittrücker, H.-W., Prechtel, S., Bischof, S., Sommer, F., Kock, S., Ferrick, D.A., Duncan, G.S., Gessner, A., and Mak, T.W. (2002). Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11808–11812.

Man, K., Miasari, M., Shi, W., Xin, A., Henstridge, D.C., Preston, S., Pellegrini, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Febbraio, M.A., et al. (2013). The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat. Immunol.* *14*, 1155–1165.

Masson, F., Minnich, M., Olshansky, M., Bilic, I., Mount, A.M., Kallies, A., Speed, T.P., Busslinger, M., Nutt, S.L., and Belz, G.T. (2013). Id2-mediated inhibition of E2A represses memory CD8+ T cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 4585–4594.

McGregor, D.D., Koster, F.T., and Mackaness, G.B. (1970). The short lived small lymphocyte as a mediator of cellular immunity. *Nature* *228*, 855–856.

Mittrücker, H.W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kündig, T.M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P.S., and Mak, T.W. (1997). Requirement for

the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275, 540–543.

Moseman, E.A., and McGavern, D.B. (2013). The great balancing act: regulation and fate of antiviral T-cell interactions. *Immunol. Rev.* 255, 110–124.

Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918–1921.

Murphy, T.L., Tussiwand, R., and Murphy, K.M. (2013). Specificity through cooperation: BATF-IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 499–509.

Nagata, S. (1996). Fas-mediated apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 406, 119–124.

Nayar, R., Enos, M., Prince, A., Shin, H., Hemmers, S., Jiang, J., Klein, U., Thomas, C.J., and Berg, L.J. (2012). TCR signaling via Tec kinase ITK and interferon regulatory factor 4 (IRF4) regulates CD8⁺ T-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2794–E2802.

Nguyen, L.T., and Ohashi, P.S. (2015). Clinical blockade of PD1 and LAG3 — potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 45–56.

Nguyen, K.B., Watford, W.T., Salomon, R., Hofmann, S.R., Pien, G.C., Morinobu, A., Gadina, M., O’Shea, J.J., and Biron, C.A. (2002). Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297, 2063–2066.

Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S., and Honjo, T. (2013). A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat. Immunol.* 14, 1212–1218.

Ou, R., Zhou, S., Huang, L., and Moskophidis, D. (2001). Critical role for alpha/beta and gamma interferons in persistence of lymphocytic choriomeningitis virus by clonal exhaustion of cytotoxic T cells. *J. Virol.* 75, 8407–8423.

Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P., Wang, G., Qi, C.-F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., et al. (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 5361–5371.

Pamer, E.G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 812–823.

Park, C., Li, S., Cha, E., and Schindler, C. (2000). Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13, 795–804.

Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202, 8–32.

- Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32, 79–90.
- Pores-Fernando, A.T., and Zweifach, A. (2009). Calcium influx and signaling in cytotoxic T-lymphocyte lytic granule exocytosis. *Immunol. Rev.* 231, 160–173.
- Powles, T., Eder, J.P., Fine, G.D., Braiteh, F.S., Loriot, Y., Cruz, C., Bellmunt, J., Burris, H.A., Petrylak, D.P., Teng, S., et al. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 515, 558–562.
- Rao, R.R., Li, Q., Gubbels Bupp, M.R., and Shrikant, P.A. (2012). Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 36, 374–387.
- Ream, R.M., Sun, J., and Braciale, T.J. (2010). Stimulation of naive CD8+ T cells by a variant viral epitope induces activation and enhanced apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 2401–2409.
- Rengarajan, J., Tang, B., and Glimcher, L.H. (2002). NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naïve T(H)cells. *Nat. Immunol.* 3, 48–54.
- Riviere, Y., Ahmed, R., Southern, P.J., Buchmeier, M.J., Dutko, F.J., and Oldstone, M.B. (1985). The S RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus codes for the nucleoprotein and glycoproteins 1 and 2. *J. Virol.* 53, 966–968.
- Rutishauser, R.L., Martins, G.A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I.A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K., and Kaech, S.M. (2009). Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* 31, 296–308.
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 207, 2187–2194.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712.
- Schiavoni, G., Mattei, F., and Gabriele, L. (2013). Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response. *Front. Immunol.* 4, 483.
- Schütt, C., and Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie* (Spektrum Akademischer Verlag).
- Sen, G.C., and Ransohoff, R.M. (1993). Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv. Virus Res.* 42, 57–102.

Shen, F.W., Saga, Y., Litman, G., Freeman, G., Tung, J.S., Cantor, H., and Boyse, E.A. (1985). Cloning of Ly-5 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7360–7363.

Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000). InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103, 501–510.

Shin, H., Blackburn, S.D., Intlekofer, A.M., Kao, C., Angelosanto, J.M., Reiner, S.L., and Wherry, E.J. (2009). A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 31, 309–320.

De Silva, N.S., Simonetti, G., Heise, N., and Klein, U. (2012). The diverse roles of IRF4 in late germinal center B-cell differentiation. *Immunol. Rev.* 247, 73–92.

Speiser, D.E., Utzschneider, D.T., Oberle, S.G., Münz, C., Romero, P., and Zehn, D. (2014). T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat. Rev. Immunol.* 14, 768–774.

Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C., et al. (2010). Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* 33, 192–202.

Suhara, W., Yoneyama, M., Yonekawa, H., and Fujita, T. (1996). Structure of mouse interferon stimulated gene factor 3 gamma (ISGF3 gamma/p48) cDNA and chromosomal localization of the gene. *J. Biochem. (Tokyo)* 119, 231–234.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.

Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., and Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 535–584.

Teijaro, J.R., Ng, C., Lee, A.M., Sullivan, B.M., Sheehan, K.C.F., Welch, M., Schreiber, R.D., de la Torre, J.C., and Oldstone, M.B.A. (2013). Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340, 207–211.

Terawaki, S., Chikuma, S., Shibayama, S., Hayashi, T., Yoshida, T., Okazaki, T., and Honjo, T. (2011). IFN- α directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2772–2779.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 735–747.

Traub, E. (1936). Persistence of Lymphocytic Choriomeningitis Virus in Immune Animals and Its Relation to Immunity. *J. Exp. Med.* 63, 847–861.

Tripp, C.S., Wolf, S.F., and Unanue, E.R. (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3725–3729.

- Tussiwand, R., Lee, W.-L., Murphy, T.L., Mashayekhi, M., Wumesh, K.C., Albring, J.C., Satpathy, A.T., Rotondo, J.A., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., et al. (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 490, 502–507.
- Utzschneider, D.T., Legat, A., Fuertes Marraco, S.A., Carrié, L., Luescher, I., Speiser, D.E., and Zehn, D. (2013). T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. *Nat. Immunol.* 14, 603–610.
- Vasanthakumar, A., Moro, K., Xin, A., Liao, Y., Gloury, R., Kawamoto, S., Fagarasan, S., Mielke, L.A., Afshar-Sterle, S., Masters, S.L., et al. (2015). The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 16, 276–285.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584–640.
- Visekruna, A., Ritter, J., Scholz, T., Campos, L., Guralnik, A., Poncette, L., Raifer, H., Hagner, S., Garn, H., Staudt, V., et al. (2013). Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* 43, 606–618.
- Waggoner, S.N., Daniels, K.A., and Welsh, R.M. (2014). Therapeutic depletion of natural killer cells controls persistent infection. *J. Virol.* 88, 1953–1960.
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12, 492–499.
- Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., and Ahmed, R. (2003a). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* 77, 4911–4927.
- Wherry, E.J., Teichgräber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., and Ahmed, R. (2003b). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* 4, 225–234.
- Wherry, E.J., Ha, S.-J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2007). Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27, 670–684.
- Wiesel, M., Crouse, J., Bedenikovic, G., Sutherland, A., Joller, N., and Oxenius, A. (2012). Type-I IFN drives the differentiation of short-lived effector CD8+ T cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* 42, 320–329.
- Wilson, E.B., Yamada, D.H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., Aronow, B.J., Karp, C.L., and Brooks, D.G. (2013). Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340, 202–207.

- Xu, H.C., Grusdat, M., Pandya, A.A., Polz, R., Huang, J., Sharma, P., Deenen, R., Köhrer, K., Rahbar, R., Diefenbach, A., et al. (2014). Type I interferon protects antiviral CD8(+) T cells from NK cell cytotoxicity. *Immunity* 40, 949–960.
- Yadav, M., Jhunjhunwala, S., Phung, Q.T., Lupardus, P., Tanguay, J., Bumbaca, S., Franci, C., Cheung, T.K., Fritsche, J., Weinschenk, T., et al. (2014). Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 515, 572–576.
- Yao, S., Buzo, B.F., Pham, D., Jiang, L., Taparowsky, E.J., Kaplan, M.H., and Sun, J. (2013). Interferon regulatory factor 4 sustains CD8(+) T cell expansion and effector differentiation. *Immunity* 39, 833–845.
- Yokoyama, W.M. (1995). Natural killer cell receptors specific for major histocompatibility complex class I molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3081–3085.
- Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188, 2205–2213.
- Zehn, D., Lee, S.Y., and Bevan, M.J. (2009). Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 458, 211–214.
- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35, 161–168.
- Zhou, S., Ou, R., Huang, L., and Moskophidis, D. (2002). Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *J. Virol.* 76, 829–840.
- Zhou, X., Ramachandran, S., Mann, M., and Popkin, D.L. (2012). Role of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) in Understanding Viral Immunology: Past, Present and Future. *Viruses* 4, 2650–2669.
- Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701–702.

7 Abkürzungsverzeichnis

α	anti	dsDNA	doppelsträngige DNA
Abb.	Abbildung	EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
AICE	AP-1-IRF <i>composite element</i>	ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
AIRE	<i>autoimmune regulator</i>	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ak	Antikörper	EICE	Ets-IRF <i>composite elements</i>
APC	Allophycocyanin	ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
APS	Ammoniumpersulfat	Eomes	Eomesdermin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle	<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
BATF	Basic leucine zipper transcription factor	FA	Formaldehyd
		FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
		FCS	Fötales Kälberserum
BCA	Bicinchinonsäure	FSC	<i>Forward Scatter</i>
BCL2/6	<i>B-cell lymphoma 2/6</i>	GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>
BLIMP1	<i>B-lymphocyte induced maturation protein1</i>	GFP	grün fluoreszierendes Protein
		h	Stunden
bp	Basenpaare	HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	HRP	<i>Horse-radish peroxidase</i>
BSS	<i>Balanced Salt Solution</i>	IAD	IRF-Assoziationsdomäne
BZR	B-Zellrezeptor	ICS	intrazelluläre Färbung
bzgl.	bezüglich	ID2/3	<i>Inhibitor of DNA binding 2/3</i>
bzw.	beziehungsweise	IFN	Interferon
CD	<i>cluster of differentiation</i>	IFNAR	Interferon Rezeptor
		Ig	Immunglobulin
cDNA	<i>complementary DNA</i>	IL	Interleukin
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation	IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis	IRF	Interferon regulierender Faktor
ConA	Concanavalin A	ISG	<i>Interferon stimulated gene</i>
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt	ISGF3	<i>Interferon stimulated gene factor 3</i>
d	Tag	ISRE	<i>Interferon-stimulated Response element</i>
		KLRG1	<i>Killer cell lektin receptor G1</i>
DBD	DNA-bindende Domäne	LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
DC	Dendritische Zelle	LCMV	Lymphocytäres Choriomeningitis Virus
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>	Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	LPS	Lipopolysaccharid
DN	doppeltnegativ	LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat	MBL	Mannose-bindendes Lektin
DP	doppeltpositiv	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
		MIG	MSCV-GFP

min	Minuten	Tab.	Tabelle
MoMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
MPEC	<i>memory precursor effector cells</i>	TBX21	<i>T-box transcription factor expressed in T cells</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
n.d.	nicht-detektierbar	TF	Transkriptionsfaktor
n.s.	nicht stimuliert	Th	T-Helfer
NaCl	Natriumchlorid	TLR	Toll-like Rezeptor
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
NFkB	<i>Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B cells</i>	Treg	regulatorische T-Zellen
NK	Natürliche Killerzelle	TZR	T-Zellrezeptor
nTreg	natürliche Treg	u.a.	unter anderem
PAMP	pathogen-assoziierte molekulare Muster	WT	Wildtyp
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	z.B.	zum Beispiel
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PE	Phycoerythrin		
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>		
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein		
PIC	Protease-Inibitor-Komplex		
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat		
pNPP	p-Nitrophenylphosphat		
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR		
rh	rekombinant human		
rr	rekombinant Ratte		
rm	rekombinant murin		
RNA	Ribonukleinsäure		
RORγt	<i>Retinoic Acid Related Orphan Receptor γ</i>		
Runx3	Runt related transcription factor 3		
RPM	<i>rounds per minute</i>		
RT	Raumtemperatur		
s	Sekunde		
SD	Standardabweichung		
SDS	Sodiumdodecylsulfat		
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
SEM	Standardfehler		
SLEC	<i>short lived effector cells</i>		
SSC	<i>Sideward Scatter</i>		
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>		

8 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1. 1</i>	<i>Schema der SLEC- und MPEC-Entwicklung während einer Infektion</i>	<i>6</i>
<i>Abb. 1. 2</i>	<i>Hierarchische T-Zellerschöpfung während einer chronischen Infektion.....</i>	<i>8</i>
<i>Abb. 1. 3</i>	<i>Die Interaktion von BATF und IRF4 an AICE-Motiven</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 1. 4</i>	<i>IRF9-Aktivierung während einer viralen Infektion.</i>	<i>12</i>
<i>Abb. 4. 1</i>	<i>Titerbestimmung in Milz und Leber nach Lm EGD-Infektion.</i>	<i>48</i>
<i>Abb. 4. 2</i>	<i>Zellzahlbestimmung nach Lm EGD-Infektion.....</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 4. 3</i>	<i>Phänotypanalyse von WT und $Irf4^{-/-}$ $CD8^{+}$ T-Zellen.</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 4. 4</i>	<i>Titerbestimmung in Milz und Leber nach Rekonstitution.</i>	<i>52</i>
<i>Abb. 4. 5</i>	<i>Phänotypanalyse der $CD8^{+}$ T-Zellen in rekonstituierten $Irf4^{-/-}$ Mäusen..</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 4. 6</i>	<i>Titerbestimmung und Frequenzanalyse von peptidspezifischen WT und $Irf4^{-/-}$ $CD8^{+}$ T-Zellen nach Lm Ova-Infektion.</i>	<i>54</i>
<i>Abb. 4. 7</i>	<i>Phänotypanalyse der peptidspezifischen WT und $Irf4^{-/-}$ $CD8^{+}$ T-Zellen nach Lm Ova Infektion.</i>	<i>55</i>
<i>Abb. 4. 8</i>	<i>Peptidspezifische Zytokinproduktion der WT und $Irf4^{-/-}$ $CD8^{+}$ T-Zellen nach Lm Ova Infektion.</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 4. 9</i>	<i>IRF4-Kinetik in $CD8^{+}$ T-Zellen in vitro und in vivo.</i>	<i>57</i>
<i>Abb. 4. 10</i>	<i>IRF4-Expression in $CD8^{+}$ T-Zellen in Korrelation mit dem Phänotyp nach Lm Ova Infektion.</i>	<i>59</i>
<i>Abb. 4. 11</i>	<i>Zellzahlbestimmung der transferierten WT und $Irf4^{-/-}$ OT-I Zellen nach Lm Ova-Infektion.</i>	<i>60</i>
<i>Abb. 4. 12</i>	<i>Zytokinproduktion von OT-I und $Irf4^{-/-}$ OT-I Zellen an Tag 6 nach Lm Ova-Infektion.....</i>	<i>61</i>
<i>Abb. 4. 13</i>	<i>Zytotoxische Aktivität der transferierten OT-I und $Irf4^{-/-}$ OT-I Zellen.....</i>	<i>63</i>
<i>Abb. 4. 14</i>	<i>mRNA-Expressionslevel von TF, die die Differenzierung von $CD8^{+}$ T-Zellen regulieren.</i>	<i>64</i>
<i>Abb. 4. 15</i>	<i>BLIMP1-Expression in $CD8^{+}$ T-Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene nach Stimulation mit IL-2, IL-12 und IL-21.....</i>	<i>66</i>
<i>Abb. 4. 16</i>	<i>Titer- und Frequenzbestimmung der antigenspezifischen OT-I und $Irf4^{-/-}$ OT-I $CD8^{+}$ T-Zellen.....</i>	<i>68</i>
<i>Abb. 4. 17</i>	<i>Zytokinproduktion der OT-I und $Irf4^{-/-}$ OT-I $CD8^{+}$ T-Zellen 40 Tage nach Lm Ova-Infektion.....</i>	<i>69</i>
<i>Abb. 4. 18</i>	<i>Proliferation und Zytokinproduktion von transferierten OT-I und $Irf4^{-/-}$ OT-I Zellen an Tag 40 p.i.....</i>	<i>70</i>

Abb. 4. 19 Frequenzanalyse der antigenspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen aus WT und Irf9 ^{-/-} Mäusen p.i.	73
Abb. 4. 20 Analyse von Aktivierungsmarkern der GP ₃₃₋₄₁ -spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen aus WT und Irf9 ^{-/-} Mäusen.	74
Abb. 4. 21 Zytokinproduktion der WT und Irf9 ^{-/-} CD8 ⁺ T-Zellen aus LCMV-infizierten Mäusen.	75
Abb. 4. 22 Analyse der zytotoxischen Moleküle der WT und Irf9 ^{-/-} CD8 ⁺ T-Zellen.	76
Abb. 4. 23 PD-1 und LAG-3-Expression von LCMV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen aus WT und Irf9 ^{-/-} Mäusen.	77
Abb. 4. 24 Bcl2 und Tbx21 mRNA-Expression in CD8 ⁺ T-Zellen aus WT und Irf9 ^{-/-} Mäusen p.i.	78
Abb. 4. 25 Frequenzanalyse der antigenspezifischen WT und Irf9 ^{-/-} CD8 ⁺ T-Zellen p.i.....	79
Abb. 4. 26 Zytokinproduktion der WT und Irf9 ^{-/-} CD8 ⁺ T-Zellen 30 Tage p.i.....	80
Abb. 4. 27 Analyse von inhibitorischen Rezeptoren auf antigenspezifischen WT und Irf9 ^{-/-} CD8 ⁺ T-Zellen.....	86

9 Publikationen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht.

‡ Teilen sich die Erstautorenschaft

Friederike Razkowski[‡], **Josephine Ritter[‡]**, Kira Heesch, Valéa Schumacher, Lena Höcker, Hartmann Raifer, Matthias Klein, Tobias Bopp, Hani Harb, Dörthe A. Kesper, Petra I. Pfefferle, Melanie Grusdat, Philipp A. Lang, Hans-Willi Mittrücker¹ and Magdalena Huber (2013). „The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8⁺ T cells." Proc Nat Acad Sci USA 2013 Sep 10;110(37):15019-24.

Vorträge

Josephine Ritter, Magdalena Huber (2012). “The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 controls CD8⁺ effector T- cell differentiation“. Annual meeting of the section T cells of the German society of immunology, June 18th/19th 2012, Alte Aula der Philipps-Universität, Marburg, Germany

Alexander Visekruna, **Josephine Ritter**, Tatjana Scholz, Lucia Campos, Anna Guralnik, Lucia Poncette, Hartmann Raifer, Stefanie Hagner, Holger Garn, Valerie Staudt, Tobias Bopp, Sebastian Reuter, Christian Taube, Karin Loser and Magdalena Huber (2013) "Tc9 cells, a new subset of CD8⁺ T cells, support Th2-mediated airway inflammation". Doktorandenretreat “Angerer Alm” des SFB/TR 22, February 25th – 27th 2013 in St. Johann in Tirol, Austria

Posterveröffentlichungen

Josephine Ritter, Lena Höcker, Hartmann Raifer and Magdalena Huber (2012). “The role of IRF4 for the development of effector- and memory CD8⁺ T cells”, Spring School on Immunology (DGfI), March 11th -16th, Ettal, Germany

10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer im Diplom-Studiengang Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg waren folgende Damen und Herren:

Bals, Bastian, Bauer S., Bauer U., Becker, Bertoune, Braun, Brehm, Burchert, Cherkasov, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Eickmann, Fritz, Garn, Garten, Glorius, Grzeschik, Huber, Jacob, Kaufmann, Klenk, Koch, Lill, Lohoff, Maisner, Moll, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Nain, Oliver, Plant, Renz, Schäfer, Schmidt, Schütz, Schwarz, Stiewe, Strecker, Suske, Westermann, Wrocklage, Yu

Meine akademischen Lehrer im Diplom-Studiengang Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald waren folgende Damen und Herren:

Alberti, Bröker, Endlich, Engelmann, Fischer, Hecker, Hildebrandt, Jabs, Marx, Müller, Peters, Schauer, Schüller, Schlosser, Schütt, Schweikhard, Thede, Wehnert, Wulff

11 Danksagung

Ungeteilter Dank geht an Prof. Dr. Magdalena Huber für die außerordentlich gute Betreuung, Hilfestellung und thematische Diskussionen im Rahmen dieses Promotionsvorhabens. Besonders danke ich ihr für ihre Erfahrung und ihre Begeisterung für die Forschung, die sie mit mir geteilt hat, wodurch ich stets mit Freude und Motivation und der von ihr gelernten Genauigkeit an meinen Projekten während der Promotion gearbeitet habe.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Markus J. Hofer, für die sehr engagierte Kooperation, durch die der zweite Teil dieser Promotionsarbeit entstanden ist sowie für die Durchführung der LCMV Arm-Infektionen und zur Verfügungstellung der *Irf9*^{-/-} Mäuse. Der wissenschaftliche Austausch und die gute Kommunikation begünstigten die Arbeit an diesem interessanten Thema.

Besonderes bedanke ich mich bei Prof. Dr. Michael Lohoff für die Möglichkeit, die Promotionsarbeit an dem vom ihm geleiteten Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene durchführen zu können.

Vielen Dank an Prof. Hans-Willi Mittrücker für die Bereitstellung der Listerien Stämme und die Einführung in die Arbeit mit Listerien.

Vielen Dank an Dr. Friederike Raczkowski bei der Einarbeitung in die Methode der Listerieninfektion und Auswertung der Titerbestimmung.

Ich danke Dr. Hartmann Raifer für die Durchführung der *Sort*-Experimente und seine immer freundliche Beratung und Unterstützung.

Ein großer Dank gilt Dr. Hani Harb für die kollegiale und freundliche Einführung und Unterstützung bei den ChIP-Experimenten.

Ich danke den MTAs Anna Guralnik und Bärbel Camara für ihre Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten sowie der Masterstudentin Angelina Neuman für die Unterstützung bei den ChIP-Experimenten.

Mein ausgesprochen großer Dank geht an Dr. Katharina Reinhard und Dr. Nadine Bollig, die bei Fragen stets ihre wissenschaftlichen Erfahrungen mit mir geteilt haben und mich durch das gewissenhafte Lesen dieser Arbeit außerordentlich unterstützt und mir Kraft gegeben haben. Sie sind großartige Kollegen und Freunde!

Vielen Dank an Dr. Evita Bothur, Anne Hellhund und Lea Boller für ihre immerwährende beratende Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit. Ein großer Dank gebührt meiner guten und auch kritischen Freundin Dr. Maike Sauer, die mich durch das Lesen der Dissertationsschrift sehr unterstützt hat.

Ein großer Dank gebührt meiner Mama und Oma, die immer an mich glauben und hinter mir stehen.

Bei Philipp Stahl, meinem Lebenspartner und Vater unseres Sohnes Karl, möchte ich mich im Besonderen bedanken. Sein Optimismus, sein Enthusiasmus, seine Liebe und sein Glauben an mich, haben mir stets die Kraft zum Durchhalten und Fertigstellen dieser Arbeit gegeben.